



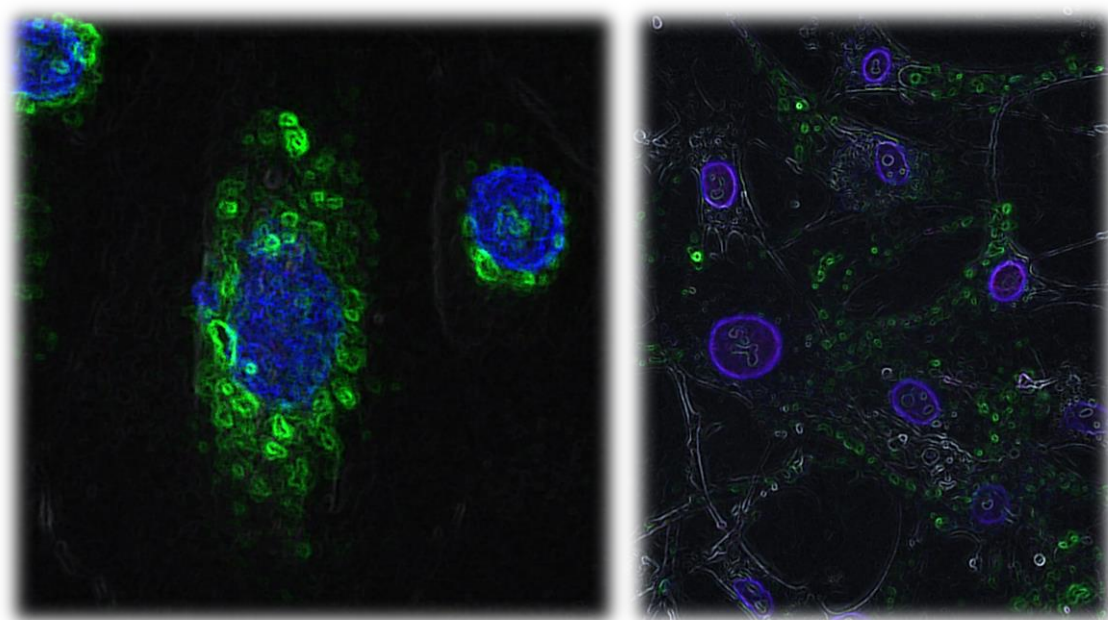
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

**SECRECIÓN DE EXOSOMAS POR
PARTE DE LOS EOSINÓFILOS. PAPEL Y
FUNCIÓN QUE DESEMPEÑAN EN LA
PATOLOGÍA ASMÁTICA**



José Antonio Cañas Mañas

Madrid, 2018

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS

Universidad Autónoma de Madrid



**SECRECIÓN DE EXOSOMAS POR
PARTE DE LOS EOSINÓFILOS. PAPEL Y
FUNCIÓN QUE DESEMPEÑAN EN LA
PATOLOGÍA ASMÁTICA**

Memoria presentada por José Antonio Cañas Mañas,
Licenciado en Biología
Para optar al título de Doctor

Directoras de Tesis:
Dra. María Victoria del Pozo Abejón
Dra. Beatriz Sara Sastre Turrión

Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz
Departamento de Inmunología

Madrid, 2018

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, en el Departamento de Inmunología, bajo la dirección de la Dra. María Victoria del Pozo Abejón y de la Dra. Beatriz Sara Sastre Turrión, con la ayuda de una beca de la Fundación Conchita Rábago.

Doña **María Victoria del Pozo Abejón**, Doctora en Ciencias Biológicas y Adjunta del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD) y Doña **Beatriz Sara Sastre Turrión**, Doctora en Ciencias e Investigadora Post-Doctoral del CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES),

CERTIFICAN:

Que Don José Antonio Cañas Mañas, Licenciado en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado “Secreción de exosomas por parte de los eosinófilos. Papel y función que desempeñan en la patología asmática”, y que una vez revisado, reúne todos los requisitos exigidos de calidad y originalidad para optar al grado de Doctor.

En Madrid, a 19 de Marzo de 2018

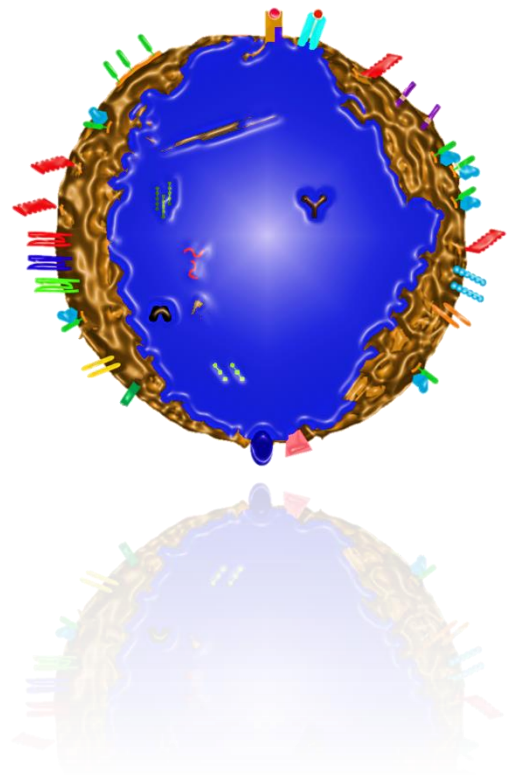
Fdo. Dra. María Victoria del Pozo Abejón

Fdo. Dra. Beatriz Sara Sastre Turrión

*Criaturas, mis maestros dijeron
que jamás llegaría a nada, y
hasta la semana pasada no
fallaron ni una. Pero ahora, he
alcanzado la perfección.*

Homer Simpson

*A mis padres y abuelos, porque
sin ellos nada hubiera sido posible*



AGRADECIMIENTOS

Quién me podría haber dicho a mí que alguna vez pudiera estar escribiendo estas palabras, con todo lo que ello supone. Después de muchos años yendo y viniendo de Madrid, en estos viajes interminables del autobús, parece que voy a cerrar otra etapa de mi vida, aunque probablemente, esta haya sido la que me haya hecho madurar personal y profesionalmente. La verdad que hay tanta gente a quien quisiera agradecer su apoyo que podría hacer casi otra tesis solo con los agradecimientos. Comencemos desde el principio.

Primero, agradecer a la Dra. Victoria del Pozo (aunque siempre será Vito) la oportunidad que me dio para poder realizar las investigaciones de mis estudios de doctorado en su laboratorio y por su apoyo y dirección a lo largo de todo este tiempo. Gracias a su ayuda, he podido madurar profesionalmente y alcanzar el rigor científico suficiente como para poder escribir este trabajo, algo impensable hace 4 años.

Segundo, a mi co-directora la Dra. Beatriz Sastre por su ayuda incondicional, por su incansable afán de que sea mejor investigador y mejor persona, y sobre todo por sus consejos tanto científicos como personales que siempre me ha dado. ¡Gracias!

También agradecer a la Fundación Conchita Rábago, y en especial a Marta, la concesión de una de las becas Conchita Rábago para poder realizar estos estudios. Gracias a ello ahora puedo decir orgulloso que he pertenecido a ese grupo selecto de personas a los que llaman “Conchitos”.

Una vez mencionadas a las personas que han tenido gran culpa de que podáis leer esto, quería agradecer a las demás personas que he conocido estos años por mi paso en la Fundación. Hay muchísima gente a quien agradecer, espero poder nombrar a todos, pero si se me olvida alguien no me lo tengáis en cuenta, me podéis poner a “caer de un burro” y estamos en paz.

A la Dra. Blanca Cárdbaga, la “jefa del laboratorio de al lado”, aunque jamás la he podido ver así, porque siempre la he considerado una compañera más, gracias a su cercanía con nosotros. Ejemplo de lucha y superación, sobre todo en este difícil mundo de la ciencia. Gracias por todos los momentos vividos, con esos cafelitos que hacían la mañana más llevadera, por tus consejos y críticas (siempre constructivas) y sobre todo por ser como eres. ¡No cambies nunca!

A la Dra. Carla Mazzeo agradecerla todo lo que me enseñó durante ese año que pudimos trabajar juntos, y sobre todo por guiarme en mis primeros pasos en el “Universo Exosomas”, porque sin esa ayuda hubiera sido imposible llegar hasta aquí. Y también gracias por tener siempre una sonrisa y poner buena cara a todos los problemas.

A mi compañera y amiga Bea (lo que he escrito más arriba era un mero formalismo doctorando Co-Directora). La verdad que no sé cómo agradecerle en unas pocas líneas todo lo que ha hecho por mí. Que conste que había oído muchas cosas buenas de ella, pero cuando llegó al laboratorio lo primero que pensé: ¡Ah Dios, ahora viene esta tía con cara de mala leche y se va a acabar la paz! Y si a eso le sumas que por hacer una insignificante extracción de RNA a algunas de sus muestras (para que viera

Agradecimientos

que yo era todo amor y bondad) te cae la primera bronca pues apaga y vámonos. Pero no, me equivocaba completamente. Y es que Bea para mi empezó siendo una compañera, pero ha terminado siendo una de mis mejores amigas, e incluso una segunda mamá (no tengas celos mamá, que madre no hay más que una) que me ha apoyado, cuidado, aconsejado y me ha enseñado muchas de las cosas de las que ahora sé. Hemos pasado muchos momentos juntos y hemos vivido muchísimas anécdotas, como esa de que “casualmente” tuvimos que coger un taxi a las 7 de la tarde porque a “alguien” se le había olvidado una “cosa” cuando llegamos a un “sitio”. Sin extenderme más, sinceramente, sólo puedo tener palabras de agradecimiento para ella y hay muchas cosas más que podría poner, pero tampoco quiero extenderme, así que acabar con cuatro palabras: ¡GRACIAS POR TODO BEA!

A José Manuel (mejor José, que si no me suena raro llamarte así), por haber entrado en el laboratorio “sin hacer ruido” y convertirse poco a poco en uno de los que maneja el cotarro. Gracias por ofrecernos tu ayuda en todo momento para cualquier cosa que necesitábamos, y por tu personalidad, con la que demuestras que con trabajo y más trabajo se puede conseguir todo lo que te propones.

A Vero, Andrés, Álvaro e Inés, todos los técnicos que han pasado por el laboratorio, gracias por vuestra ayuda en todo momento, tanto en lo personal como en lo profesional. Entre ellos destacar a dos personas, que son con las que más he coincidido. Andrés, una auténtica “bestia” trabajando, con unos conocimientos inmensos y que me ayudó muchísimo en todos mis experimentos y que gracias a él pudimos sacar mucho trabajo adelante. Inés, una de esas personas “revolucionarias”, y aunque hayamos tenido nuestros más y nuestros menos debido a mi “intensidad”, agradecerla toda su ayuda durante el tiempo que he trabajado con ella.

Y al último recién llegado al laboratorio, Daniel. Gracias por aguantar mis explicaciones (que sé que te freía la oreja durante un buen rato), pero espero que, te hayas quedado con una buena impresión de mí.

También mencionar a Mari Paz y Cris, aunque no hayamos tenido la oportunidad de trabajar juntos, las veces que he coincidido con vosotras ha sido un verdadero placer.

A todos los resis que han pasado por el laboratorio: Silvia, Ruth, Katherine, Yesenia, Ana en plural (las dos de Alcorcón), María José, Alberto, Juan David, Gema, Elena, Alicia (no sé si me dejo a alguien, si es así disculpad, pero habéis sido muchos y muy buenos compañeros todos). Hacer especial mención a cuatro de ellos: Pili, Jesús, Stalyn y Marcela, ya que con ellos he tenido una relación más cercana, aparte de compartir la “parte buena” de los congresos.

A mis compis del Labo 2, Selene, David y Lucía. ¿Qué puedo decir de ellos? Pues obviamente solo cosas buenas, una lástima que hubiera paredes entre nosotros, porque todos juntos hubiéramos formado un excelente equipo. Gracias a todos por vuestro buen humor y simpatía (aunque en esto gana Lucía con mucha diferencia, gracias a sus lémures y sus serpientes de tres toneladas) y por vuestra ayuda y consejos en todo momento en que lo he necesitado.

Al actual personal del servicio de Alergia de la FJD y a los que ya se han ido, alergólogos: al Dr. Joaquín Sastre, Mar, Manuel, Silvia, Pamela, Aída, y técnicos: Eri y Manoli (que siempre que había MEGA y podía me escapaba a veros un ratito). También mencionar a los alergólogos Dr. Santiago Quirce y a la Dra. Pilar Barranco del Servicio de Alergia del Hospital la Paz. Gracias a todos ellos por proporcionarnos las muestras biológicas para desarrollar el estudio, que sin su ayuda y trabajo esto no se podría haber llevado a cabo.

A todas las personas del laboratorio del Dr. Fernando Vivanco, a los que están y a los que ya no están: Gloria, Carlos, Marta, Laura, Aroa, Van, Arancha, Cons y Alma. Unos verdaderos profesionales, excelente científicos y mejores personas.

A toda la gente de Nefro, una “jauría” compuesta por “millones” de personas, que entran y salen, vienen y se van, en resumidas cuentas, todo un caos dentro del orden. Pero gracias a todos por lo que me habéis ayudado y por ser tan buena gente. Por poner nombres entre tantos a mencionar: Raúl, Cristian, Morgui, Sandra, Nerea (agradecerte los momentos compartidos en Helsinki), Kike, Lara, Mel, Alfonso y Ernesto (dúo inseparable como Zipi y Zape), Laura, Alberto, Juanma, Juanito y, en general a todos.

A las chicas de reuma, terapias y neuro, aunque principalmente hayamos coincidido por los pasillos o en el citómetro, siempre mostrabais esa sonrisa en la cara que alegraba a todo el mundo.

Agradecer el trabajo de cuatro personas: Pilar, Julia, Isabel y Amelia. Las auxiliares de la FJD, que sin duda sin su trabajo no podríamos hacer nada de nada. Y, obviamente, agradecer esas conversaciones en el cuarto de los microondas justo antes de comer, que tanto he agradecido (y que, por ello, tantas veces me han llamado pesado por bajar a comer 20 o 30 insignificantes minutos más tarde).

Agradecer en especial a Curra su ayuda con el microscopio confocal, aparato que evitaba utilizar (porque al igual que el pHmetro y el citómetro es otro de los aparatos creados por el Diablo), pero ella me enseñó a sacar unas imágenes alucinantes que al final me engancharon y estaba deseando bajar a hacer ensayos de microscopía confocal. También agradecerla las largas charlas que en ese confesionario hemos tenido, que si nos dejan un par de experimentos más arreglamos el mundo entre los dos.

Al Dr. Manuel Izquierdo dar las gracias por haberme enseñado y ayudado con el microscopio de epifluorescencia para realizar varios de los ensayos descritos en esta tesis.

Mención especial a dos excelentes alergólogos: Luis y Rafa. El primero de ellos de tierras castellanas como yo (y no del Reino de León como dicen los de tu “pueblo”) y una de las mejores personas que habré conocido durante estos 4 últimos años. Siempre dispuesto a ofrecer su ayuda en lo que fuera y siempre se portó de manera excepcional conmigo en todas las ocasiones que hemos coincidido, especialmente durante los congresos. Y Rafa, compañero de fatigas de Luis, otra excelente persona

Agradecimientos

siempre dispuesto a ayudarme en lo que necesitara, lástima que sólo nos veamos de congreso en congreso.

Probablemente, ahora vienen los agradecimientos a las personas que, aunque no hayan estado en el laboratorio, me han ayudado de otra manera para poder afrontar esto.

Primero gracias a mis padres, Antonio y Pilar (papa y mama para entendernos), que sin duda esto no lo habría conseguido de ninguna manera. Su apoyo, tesón, fortaleza y cariño hacia mi han hecho que pueda conseguirlo. Bueno eso y que mi madre me despertara todas las mañanas con el desayuno puesto y la comida hecha (que he sido la envidia de muchos por cómo me tratabas), porque si no es por eso habría perdido el autobús día sí y día también. Y gracias a mi padre por su apoyo, cariño y por todo lo que me ha dado siempre, porque, aunque no me haya podido convertir en Doctor en Parasitología, como me decía, he podido conseguir algo parecido.

A mis abuelos: Paula, Tanis y Feliciano, por cuidarme siempre como mis segundos padres y darme siempre un cariño incondicional. Pero en especial mi abuelo Cañas, porque, aunque nos hayas dejado hace poco, espero que desde allí arriba te puedas seguir sintiendo orgullo de mí y seguir presumiendo de tu nieto el biólogo.

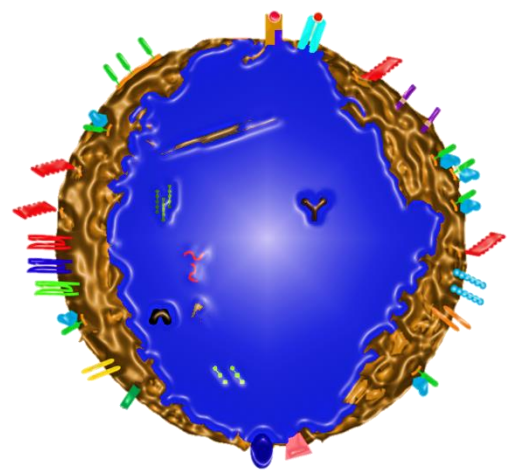
Y también al resto de mi familia, mis tías (Raquel, Tere, Moni y Cruz), tíos (Javi), primos (Iván, Alba, Dani y Marta), por vuestro apoyo y vuestro cariño siempre hacia mí.

A mis amigos Guille, Jarry, Roque, Asenjo, peculiares donde les haya, pero que también han sabido estar en todas las situaciones difíciles dándome su apoyo y consejo. También agradecer a Kiko, mi “pareja de hecho” en el mundo del arbitraje, las largas conversaciones mantenidas en esos interminables viajes por cada rinconcito de Castilla y León.

A mis futura suegra y cuñada Rosa y Sara, gracias por tratarme siempre como si fuera de vuestra familia, por acogerme entre vosotras y por estar de bromas muchas veces, sacándome una sonrisa y haciendo esto mucho más fácil.

Y, por último, junto con mis padres, otra de las personas más importantes que he tenido la suerte de conocer, y sí, eres tú Estela. Agradecer todo lo que me has dado durante todo este tiempo, tu apoyo, cariño, consejos, fuerza para seguir adelante, pero sobre todo por haberme aguantado tanto tiempo y en situaciones en las que el agobio me hacía ser un poco cansino. Gracias por todo lo vivido a tu lado y espero que sea durante toda mi vida. Por cierto, ¿te acuerdas de lo que te dije cuando terminara la tesis?, seguramente digas que no, pero yo sé que es sí, pues ya sabes ve pensando fecha (guiño, guiño) y aprovecha de que aún sigo en mis años mozos y lustrosos.

Espero no haberme olvidado de nadie y si es así mis disculpas, pero habéis sido tantos y tan buena gente que al final me quedo sin sitio en mi cabeza para acordarme. MUCHAS GRACIAS A TODOS.



RESUMEN

SUMMARY

El asma, enfermedad crónica de las vías respiratorias, se caracteriza por la obstrucción variable del flujo aéreo, la hiperrespuesta bronquial y el remodelado de las vías respiratorias. Existen varios tipos celulares implicados en estos procesos, algunos de los cuales son los eosinófilos, las células epiteliales de las vías respiratorias y las células del músculo liso bronquial.

Los eosinófilos, principal célula efectora del asma, son granulocitos que se caracterizan por contener numerosos gránulos en su interior. Se ha hipotetizado que alguno de estos gránulos pudiera corresponder con cuerpos multivesiculares involucrados en la biogénesis de los exosomas (nanovesículas extracelulares, de entre 30-100 nm de diámetro, implicadas en la comunicación intercelular). Estas vesículas pueden contener en su interior microARN (miARN), que son pequeños ARN no codificantes, con un papel fundamental en la regulación génica post-transcripcional.

El presente trabajo tiene como objetivo principal demostrar la liberación de exosomas al exterior celular por parte de los eosinófilos circulantes y su posible papel en los procesos que caracterizan a la patología asmática. También se pretende identificar un perfil diferencial de miARN entre eosinófilos procedentes de sujetos sanos y de individuos asmáticos.

Para desarrollar el estudio, se purificaron eosinófilos de sangre periférica de individuos sanos y de pacientes asmáticos. Tras su cultivo, se aislaron los exosomas liberados al medio por estas células, los cuales se emplearon en la realización de ensayos funcionales con los propios eosinófilos y células estructurales del pulmón: las células epiteliales de vías respiratorias pequeñas y las células del músculo liso bronquial. Por otro lado, se purificó el ARN total de los eosinófilos para estudiar, mediante secuenciación masiva, el perfil de miARN existente en los eosinófilos de ambos tipos de sujetos.

En este estudio, se ha demostrado que los eosinófilos tienen cuerpos multivesiculares funcionales capaces de producir y secretar exosomas, siendo mayor esta secreción en eosinófilos procedentes de pacientes asmáticos que la de los eosinófilos de individuos sanos. En eosinófilos, los exosomas procedentes de pacientes asmáticos aumentan la capacidad de adhesión y de migración mediante el incremento de la expresión de moléculas de adhesión y del receptor CCR3. También son capaces de aumentar la producción y liberación de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno.

Por otra parte, los exosomas de eosinófilos de pacientes con asma inducen apoptosis y retrasan la reparación del daño en las células epiteliales e incrementan la proliferación de las células del músculo liso bronquial. Además, aumentan la expresión génica de varias citocinas y mediadores pro-inflamatorios (*TNF*, *CCL26*, *POSTN*, *CCR3* y *VEGFA*) y modifican el estado de fosforilación de varios factores de señalización implicados en el asma (*AKT*, *STAT3* y *ERK1/2*).

Por último, se ha encontrado un perfil diferencial de miARN entre eosinófilos de sujetos sanos y de pacientes asmáticos capaz de distinguir ambos estatus.

Como conclusión, los eosinófilos de pacientes asmáticos son capaces de liberar una mayor cantidad de exosomas, los cuales actúan sobre los propios eosinófilos y sobre otras células estructurales del pulmón, alterando diferentes procesos característicos de la patología asmática.

Asthma, a chronic inflammatory disease of the airways, is characterized by variable airflow obstruction, bronchial hyperresponsiveness and airway remodeling. There are several cell types implicated in these processes, such as eosinophils, small airway epithelial cells and bronchial smooth muscle cells.

Eosinophils are the main effector cell of asthma disease. These cells are granulocytes that are characterized by containing numerous intracellular granules. Probably, some of these granules could correspond to multivesicular bodies involved in the biogenesis of exosomes (extracellular nanovesicles, between 30-100 nm in diameter, implicated in intercellular communication). These vesicles may contain microRNA (miRNA), which are small non-coding RNA that play a fundamental role in post-transcriptional gene regulation.

The main objective of this work is to demonstrate the release of exosomes to the extracellular medium by circulating eosinophils, and their possible roles in several processes that characterize the asthmatic pathology. We also try to identify a distinctive miRNA profile between eosinophils from healthy subjects and asthmatic patients.

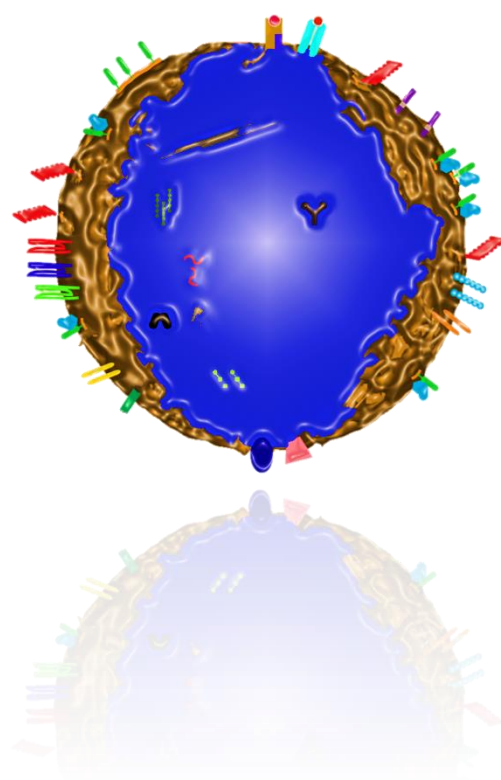
To develop this study, peripheral blood eosinophils were purified from healthy individuals and asthmatic patients. After eosinophil culture, the exosomes released into the microenvironment by these cells were isolated and were used to perform functional assays with the eosinophils from asthmatics and with structural lung cells: small airway epithelial cells and bronchial smooth muscle cells. In addition, total eosinophil RNA was purified to study, through next generation sequencing, the miRNA profile present in eosinophils from both subject groups.

In this study, we demonstrated that eosinophils have functional multivesicular bodies that are able to produce and release exosomes. This release is greater in eosinophils from asthmatic patients than eosinophils from healthy individuals. According to the eosinophil functional assays, exosomes from asthmatic patients augment adhesion and migration ability by increasing expression of the adhesion molecules and the CCR3 receptor. They are also able to rise the production and secretion of nitric oxide and reactive oxygen species.

On the other hand, eosinophil-derived exosomes from asthmatic patients induce apoptosis and delay the epithelial repARATION in epithelial cells and increase the proliferation of bronchial smooth muscle cells. Moreover, these exosomes increase the gene expression of several pro-inflammatory mediators and cytokines (*TNF*, *CCL26*, *POSTN*, *CCR3* and *VEGFA*), and they modify the phosphorylation levels of several signaling factors involved in asthma (AKT, STAT3 and ERK1/2).

Finally, we have found a differential miRNA profile between eosinophils from healthy subjects and asthmatic patients that is able to distinguish both status.

In conclusion, the eosinophils of asthmatic patients release higher quantity of exosomes that act on the eosinophils themselves and on structural lung cells. This kind of exosomes modifies different characteristic processes of the asthmatic pathology.



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
ABREVIATURAS	I
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ASMA.....	3
1.1.1. Características del asma.....	3
1.1.2. Fisiopatología del asma	4
1.1.3. Papel del epitelio respiratorio y de la musculatura lisa bronquial en el desarrollo de la patología asmática.....	6
1.2. CÉLULAS EFECTORAS EN EL ASMA: EL EOSINÓFILO	8
1.2.1. Morfología y características de los eosinófilos	8
1.2.2. Biogénesis y maduración del eosinófilo.....	9
1.2.3. Características celulares y funciones de los eosinófilos.....	11
1.2.4. Degranulación de los eosinófilos.....	13
1.3. EXOSOMAS: BIOGÉNESIS, MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN	15
1.3.1. Biogénesis de los exosomas.....	16
1.3.2. Morfología y función de los exosomas.....	17
1.4. MICROARN: BIOGÉNESIS Y FUNCIÓN.....	18
1.4.1. Biogénesis de los miARN.....	18
1.4.2. Función y mecanismo de los miARN.....	20
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1. SELECCIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO.....	29
3.2. CONSIDERACIONES ÉTICAS DEL ESTUDIO.....	29
3.3. PURIFICACIÓN DE EOSINÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA.....	30
3.4. CULTIVOS CELULARES	31

3.4.1. Cultivo de eosinófilos	31
3.4.2. Cultivo de células epiteliales de vías respiratorias pequeñas (SAEC)	32
3.4.3. Cultivo de células del músculo liso bronquial (BSMC).....	33
3.5. PURIFICACIÓN DE EXOSOMAS PROCEDENTES DE EOSINÓFILOS	33
3.6. CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS DE EOSINÓFILOS.....	34
3.6.1. Identificación de cuerpos multivesiculares y exosomas de eosinófilos.....	34
3.6.1.1. Microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal de cuerpos multivesiculares	34
3.6.1.2. Microscopía electrónica de transmisión de cuerpos multivesiculares y exosomas	35
3.6.2. Movilización y secreción de exosomas.....	36
3.6.2.1. Inducción e inhibición de la secreción de exosomas.....	36
3.6.2.2. Movilización de los gránulos del eosinófilo	36
3.6.2.2.1. Ensayos de transfección y expresión del vector.....	36
3.6.2.2.2. Microscopía de epifluorescencia.....	36
3.6.2.2.3. Citometría de flujo	37
3.6.3. Caracterización morfológica y proteica de los exosomas.....	37
3.6.3.1. Análisis de seguimiento de nanopartículas.....	37
3.6.3.2. Espectrometría de masas	38
3.7. ENSAYOS FUNCIONALES EN EOSINÓFILOS Y EN CÉLULAS ESTRUCTURALES DE PULMÓN	38
3.7.1. Apoptosis.....	38
3.7.1.1. Ensayos de anexina V.....	38
3.7.1.2. Ensayos de TUNEL.....	39
3.7.2. Estudio de la adhesión celular y la migración en eosinófilos.....	40
3.7.2.1. Adhesión.....	40
3.7.2.2. Migración (Quimiotaxis y Quimiocinesis)	41
3.7.2.3. Moléculas de adhesión y receptor implicado en la migración.....	41
3.7.3. Determinación de la producción de óxido nítrico	42
3.7.4. Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	42

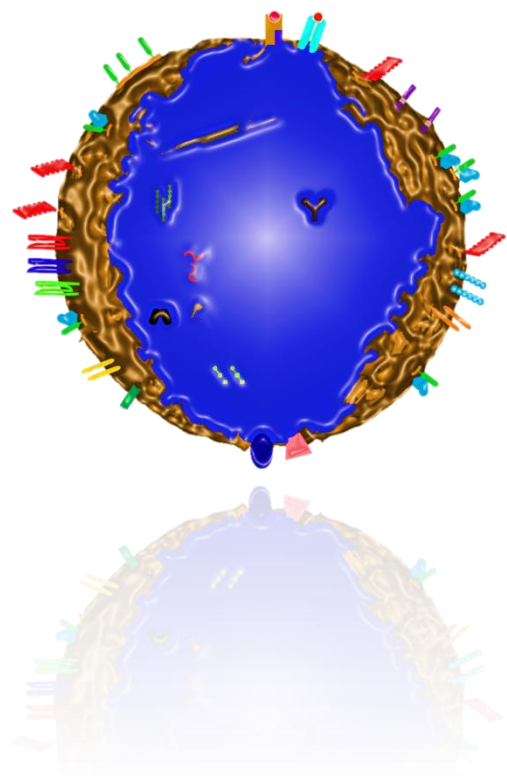
3.7.5. Reparación del daño epitelial establecido (ensayos de cierre de herida)	43
3.7.6. Hiperplasia de células del músculo liso bronquial (BSMC)	43
3.7.6.1. Proliferación	43
3.7.6.2. Inhibición de la proliferación	44
3.7.7. Mecanismo de actuación de los exosomas	44
3.7.7.1. Microscopía confocal de eosinófilos	44
3.7.7.2. Microscopía confocal de células estructurales	45
3.8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS Y MEDIADORES PRO-INFLAMATORIOS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL	46
3.8.1. Obtención de las muestras	46
3.8.2. Extracción del ARN	46
3.8.3. Síntesis del ADN complementario	46
3.8.4. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real	47
3.9. MEDIDA DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	47
3.9.1. Identificación y cuantificación de proteínas mediante western blot	47
3.9.1.1. Obtención de extractos proteicos	47
3.9.1.2. Inmunodetección de proteínas	48
3.9.2. Cuantificación de periostina en plasma	50
3.10. EVALUACIÓN DE miARN DE EOSINÓFILOS Y DE SUS EXOSOMAS	50
3.10.1. Secuenciación de nueva generación	50
3.10.1.1. Homogeneización de las muestras	50
3.10.1.2. Extracción del ARN total enriquecido en miARN	50
3.10.1.3. Precipitación del ARN	51
3.10.1.4. Secuenciación de nueva generación Illumina	51
3.10.2. Confirmación de miARN de eosinófilos	52
3.10.2.1. Síntesis de ADN complementario	52
3.10.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real de miARN	52
3.10.3. Análisis bioinformático	53
3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53

4. RESULTADOS	55
4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS DE LOS INDIVIDUOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO	57
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXOSOMAS PROCEDENTES DE EOSINÓFILOS	58
4.2.1. Identificación de cuerpos multivesiculares en los eosinófilos.....	58
4.2.2. Movilización de los gránulos intracelulares, secreción y caracterización de exosomas.....	59
4.2.2.1. Movilización de gránulos intracelulares inducida por IFN- γ	60
4.2.2.2. Secreción y caracterización de los exosomas de eosinófilos	61
4.2.2.2.1. Análisis de proteínas exosomales y regulación de la secreción de exosomas	61
4.2.2.2.2. Caracterización de los exosomas	63
4.2.2.3. Perfil proteico de los exosomas de eosinófilos	65
4.2.2.3.1. Identificación de proteínas características de eosinófilos en lisados exosomales	65
4.2.2.3.2. Análisis del contenido proteico de los exosomas	65
4.3. PAPEL DE LOS EXOSOMAS EN LA FUNCIONALIDAD DE LOS EOSINÓFILOS	66
4.3.1. Efectos de los exosomas en la apoptosis de los eosinófilos.....	66
4.3.2. Adhesión y migración de los eosinófilos.....	67
4.3.2.1. Efecto de los exosomas en la capacidad de adhesión de los eosinófilos	68
4.3.2.2. Análisis de la migración de los eosinófilos inducida por los exosomas	68
4.3.2.2.1. Quimiotaxis en eosinófilos.....	69
4.3.2.2.2. Quimioquinesis en eosinófilos	70
4.3.2.3. Papel de los exosomas sobre la expresión de moléculas de adhesión y de un receptor específico asociado a la migración	70
4.3.2.3.1. Moléculas de adhesión del eosinófilo	70
4.3.2.3.2. Efecto de los exosomas en la expresión de CCR3 en eosinófilos.....	71
4.3.3. Papel de los exosomas en la producción de óxido nítrico (NO) y de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	72
4.3.3.1. Efecto de los exosomas en la producción de óxido nítrico	72

4.3.3.2. Efecto de los exosomas en la liberación de especies reactivas de oxígeno.....	73
4.3.4. Captación de los exosomas por los eosinófilos.....	73
4.4. EFECTO DE LOS EXOSOMAS EN LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS ESTRUCTURALES DEL PULMÓN.....	75
4.4.1. Ensayos funcionales en células epiteliales de vías respiratorias pequeñas (SAEC).....	75
4.4.1.1. Apoptosis y daño epitelial.....	75
4.4.1.1.1. Papel de los exosomas en la apoptosis de las SAEC.....	75
4.4.1.1.2. Efecto de los exosomas en la reparación del daño epitelial.....	76
4.4.1.2. Expresión génica de diferentes factores pro-inflamatorios en las SAEC	77
4.4.1.2.1. Expresión génica en células epiteliales sin daño establecido	77
4.4.1.2.2. Expresión génica en células epiteliales con daño establecido.....	78
4.4.1.3. Evaluación de las vías de señalización PI3K/AKT y JAK/STAT	79
4.4.1.4. Captación de los exosomas por las SAEC	80
4.4.2. Ensayos funcionales en células del músculo liso bronquial (BSMC).....	81
4.4.2.1. Evaluación de la proliferación de las células del músculo liso bronquial.....	81
4.4.2.2. Evaluación de la vía de señalización MAPK/ERK.....	82
4.4.2.3. Expresión génica de factores angiogénicos y fibróticos en las BSMC	83
4.4.2.4. Captación de los exosomas por las BSMC.....	84
4.5. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE MICROARN DE EOSINÓFILOS Y DE SUS EXOSOMAS	85
4.5.1. MiARN de eosinófilos.....	85
4.5.1.1. Estudio por secuenciación de nueva generación de la expresión de los miARN de eosinófilos	85
4.5.1.2. Validación de los miARN con expresión diferencial	86
4.5.1.3. Análisis de clusters de los miARN diferencialmente expresados en eosinófilos	87
4.5.1.3.1. Análisis de componentes principales (PCA) y agrupamiento de las muestras de miARN de origen eosinofílico.....	87
4.5.1.3.2. Comparaciones de los miARN entre los diferentes grupos establecidos	88
4.5.2. MiARN de exosomas de eosinófilos.....	89

Índice

4.5.2.1. Estudio de miARN en exosomas procedentes de eosinófilos.....	89
4.5.2.2. Análisis de componentes principales y agrupamiento de las muestras de miARN exosomales.....	90
5. DISCUSIÓN.....	91
5.1. BÚSQUEDA, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS LIBERADOS POR LOS EOSINÓFILOS	93
5.2. ESTUDIO DEL EFECTO AUTOCRINO QUE EJERCEN LOS EXOSOMAS SOBRE LAS PRINCIPALES CÉLULAS EFECTORAS DEL ASMA: LOS EOSINÓFILOS	96
5.3. EFECTO E INTERACCIÓN DE LOS EXOSOMAS DE EOSINÓFILOS SOBRE LA ESTRUCTURA PULMONAR: CÉLULAS EPITELIALES Y MUSCULARES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS	100
5.3.1. <i>Efecto de los exosomas eosinofílicos de origen asmático sobre las células epiteliales de vías respiratorias pequeñas</i>	101
5.3.2. <i>Efecto de los exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos sobre las células del músculo liso bronquial</i>	103
5.4. IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL DIFERENCIAL DE miARN ENTRE EOSINÓFILOS DE SUJETOS SANOS Y ASMÁTICOS	105
6. CONCLUSIONES	109
7. BIBLIOGRAFÍA	113
ANEXO I	139
ANEXO II	147
PUBLICACIONES A LAS QUE HA DADO LUGAR ESTA TESIS.....	149
ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS	187



ABREVIATURAS

15-HETE	Ácido 15-hidroxicosatetraenoico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AGO	Proteína argonauta
AKT	Proteína quinasa B
ALIX (PDCD6IP)	Proteína 6 de interacción en la muerte programada
APRIL	Ligando inductor de la proliferación
ARNm	ARN mensajero
ARN Pol	ARN polimerasa
BrDU	5'-bromo-2'-deoxiuridina
BSA	Albúmina de suero bovino
BSMC	Células del músculo liso bronquial
CCL	Ligando de quimiocina (motivo CC)
CCR	Receptor de quimiocina (motivo CC)
CCR3	Receptor de quimiocina 3 (motivo CC)
CD	<i>Cluster</i> de diferenciación
CEIC	Comité de Ética de Investigación Clínica
cpm	Cuenta por millón
Ct	Ciclo umbral
CXCL	Ligando de quimiocina (motivo CXC)
CysLT	Cisteinil leucotrienos
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DE	Desviación estándar
DGCR8	Subunidad DGCR8 (región crítica 8 del síndrome de DiGeorge) del complejo microprocesador
Dicer	Endorribonucleasa Dicer
D.O.	Densidad óptica

Abreviaturas

dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
Drosha	Ribonucleasa III Drosha
ECL	Potenciador de la quimioluminiscencia
ECP	Proteína catiónica del eosinófilo
EDN	Neurotoxina derivada del eosinófilo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EPO	Peroxidasa del eosinófilo
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERK1/2	Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2
ESCRT	Complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte
EXP5	Exportina 5
Fc	Fracción constante de inmunoglobulinas
FDR	Tasa de falsos descubrimientos
FeNO	Fracción exhalada de óxido nítrico
FEV ₁	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLG	Filagrina
FVC	Capacidad vital forzada
GAG	Antígeno específico de grupo
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína verde fluorescente
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
H ₂ DCF-DA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
HLA	Antígeno leucocitario humano
HRP	Peroxidasa de rábano
HSP	Proteína de choque térmico
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN- γ	Interferón gamma
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IIS-FJD	Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz
IL	Interleucina
ILC2	Célula linfoide innata de tipo 2
ILV	Vesículas intraluminales
IMF	Intensidad media de fluorescencia
JAK/STAT	Quinasa Janus/factor transductor de la señal y activador de la transcripción
LAMP	Proteína de membrana asociada a lisosomas
LBPA	Ácido lisobisfosfatídico
LFA-1	Antígeno asociado a la función de linfocitos 1
LT	Leucotrieno
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MBP	Proteína mayor básica
MCP	Proteína quimiotáctica de monocitos
MHC I	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
miARN	MicroARN
MIP-1 δ	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta
MVB	Cuerpos multivesiculares

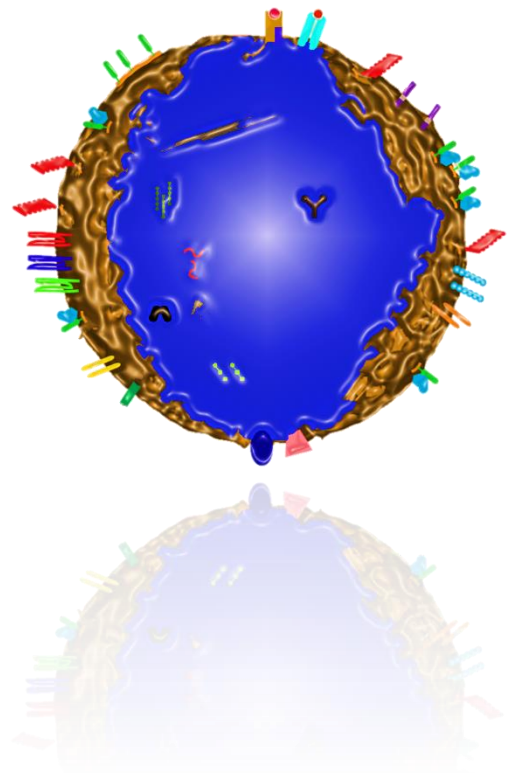
Abreviaturas

NGF	Factor de crecimiento nervioso
NGS	Secuenciación de nueva generación
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
<i>p</i>	Valor p
PAF	Factor activador de plaquetas
PAGE-SDS	Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (dodecil sulfato sódico)
pAKT	Proteína quinasa B fosforilada
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PC ₂₀	Concentración de metacolina que causa una caída del 20% respecto al FEV ₁ basal
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE	Ficoeritrina
pERK1/2	Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 fosforilada
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PI	Yoduro de propidio
PI3K/AKT	Fosfatidilinositol quinasa 3/Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PKCi	Inhibidor de la proteína quinasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Pre-miARN	MicroARN precursor
Pri-miARN	MicroARN primario
pSTAT3	Factor transductor de la señal y activador de la transcripción 3 fosforilado

PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RANTES	Quimiocina secretada y expresada por linfocitos T normales regulada por activación
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
ROI	Región de interés
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
SAEC	Células epiteliales de vías respiratorias pequeñas
SCF	Factor de célula madre
SIGLEC8	Lectina de tipo inmunoglobulina de unión a ácido siálico 8
STAT3	Factor transductor de la señal y activador de la transcripción 3
STFi	Suero de ternera fetal inactivado
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Factor transformante de crecimiento beta
Th	Célula T cooperadora
Th1	Células T cooperadoras de tipo 1
Th2	Células T cooperadoras de tipo 2
TLR	Receptor tipo Toll
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRBP	Proteína TAR de unión a ARN
TSG101	Proteína del gen 101 de susceptibilidad tumoral
TSLP	Linfopoyetina del estroma tímico
TUNEL	Siglas del término en inglés <i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
UTR	Región no traducida del ARN mensajero
VCAM-1	Molécula de adhesión a células vasculares 1

Abreviaturas

VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VLA-2	Antígeno de activación tardía 2
VLA-4	Antígeno de activación tardía 4
VPS4	Proteína vacuolar de clasificación 4
<i>vs.</i>	<i>Versus</i>
VTa1	Proteína homóloga de VTA1 asociada a la proteína de clasificación vacuolar



1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASMA

El asma, enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, es una patología de gran complejidad y de carácter multifactorial. Aunque fue descrita por primera vez en 1859 por Henry Hyde Salter [1] como una patología concreta e independiente, hoy en día, pese a la gran cantidad de estudios realizados, aún se desconocen múltiples aspectos relacionados con su etiología y evolución [2].

En la actualidad, se estima que el asma afecta a más de 200 millones de personas con cerca de 380.000 muertes anuales y además, se ha constatado que existe un progresivo aumento de su prevalencia, afectando a un intervalo de población entre un 7% y un 20% [3], siendo la enfermedad crónica más común de la infancia en los países occidentales y/o industrializados [4]. Debido al elevado impacto clínico, social, y al enorme coste sanitario que conlleva, el asma constituye un problema, no resuelto, de enorme interés socio-sanitario y económico [5,6].

1.1.1. Características del asma

La definición más consensuada de asma se debe a la iniciativa GINA (*Global Initiative for Asthma*) [7], considerando las características clínicas, fisiológicas y patológicas de la enfermedad:

“El asma es una enfermedad heterogénea, usualmente caracterizada por la inflamación crónica de las vías respiratorias. Está definida por la historia de los síntomas respiratorios como sibilancias, falta de aire, opresión torácica y tos, que varían en el tiempo y en intensidad, junto con la obstrucción variable del flujo pulmonar”.

En esta patología se encuentran implicados diferentes factores genéticos [4], nutricionales [8] y ambientales [9]; asimismo, se considera que puede estar vinculada al cambio climático [10] y a los oxidantes endógenos y exógenos [11]. Por una parte, los factores intrínsecos al individuo (principalmente genéticos) tienen que ver con el desarrollo de la enfermedad y son aquellos que predisponen a la atopia y la hiperrespuesta de las vías respiratorias. Por otro lado, se encuentran los factores ambientales, los cuales intervienen en la sintomatología como son los alérgenos, las infecciones víricas o bacterianas, el humo de tabaco, la polución y la dieta [12].

Aunque en algunos casos el desarrollo y evolución del asma no están del todo claros, se considera una patología de base inmunológica que se produce tras exposiciones ambientales a alérgenos (proteínas inocuas para la mayor parte de la población), agentes infecciosos o sustancias contaminantes en pacientes con susceptibilidad genética a padecer esta enfermedad [1,13]. Cabe destacar la relevancia que tiene la atopia (predisposición genética para desarrollar una respuesta mediada por inmunoglobulina E [IgE]) en esta enfermedad, ya que se considera el principal factor de riesgo para la aparición del asma alérgica [14].

En cuanto a su patogenia, el asma se caracteriza por la presencia de inflamación de predominio eosinofílico, hipersecreción de moco e hiperrespuesta bronquial. Esto provoca cambios

Introducción

fisiopatológicos en las vías respiratorias que originan la mayoría de los síntomas del asma. La Figura 1 refleja las principales diferencias morfológicas que existen entre el bronquio de un sujeto sano y de un paciente asmático.

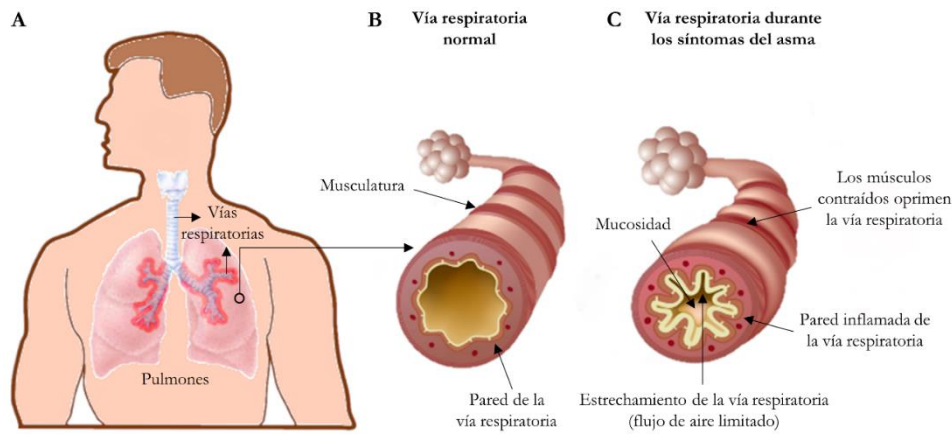


Figura 1. Alteraciones fisiológicas características de las vías respiratorias que tienen lugar en la patología del asma. A. Imagen de la estructura general del aparato respiratorio. B. Bronquio de un individuo sano sin alteraciones. C. Bronquio de un paciente con asma donde se observa: hipertrofia de la musculatura lisa bronquial, edema de la pared, engrosamiento de la pared de las vías respiratorias, hipersecreción de moco y remodelado de la pared bronquial que conlleva al estrechamiento del lumen. Esquema modificado de A.D.A.M. Education.

El infiltrado inflamatorio existente, aunque clásicamente asociado a un predominio eosinofílico, también puede estar constituido por neutrófilos, macrófagos, mastocitos y linfocitos T (principalmente CD4⁺). Este infiltrado está ligado a la liberación de citocinas, quimiocinas y mediadores pro-inflamatorios y/o citotóxicos, los cuales contribuyen al mantenimiento de la inflamación [15].

1.1.2. Fisiopatología del asma

El proceso fisiopatológico del asma alérgica se puede subdividir en dos etapas:

1. **FASE TEMPRANA.** Esta fase se inicia a los pocos minutos del contacto con el alérgeno activándose la respuesta inmune de tipo 2 desencadenada por la etapa previa de sensibilización a determinados alérgenos. La entrada del alérgeno desencadena un proceso de activación de las células con receptores para IgE, principalmente los mastocitos. Esta unión a los receptores de la superficie celular produce, por parte de los mastocitos activados, la liberación de mediadores pro-inflamatorios como la histamina y las especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otros. Todos estos factores que participan en la respuesta inflamatoria generan la contracción del músculo liso de las vías respiratorias, la secreción de moco, el aumento de la permeabilidad vascular y la extravasación de plasma.
2. **FASE TARDÍA.** Ocurre entre las 6-8 horas tras la exposición al alérgeno. Durante esta fase, se produce el reclutamiento y activación de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, basófilos y células T CD4⁺ hacia las vías respiratorias, ocasionando un aumento de la expresión de

moléculas de adhesión y de la liberación de mediadores pro-inflamatorios. Todos estos procesos dan como resultado la obstrucción de las vías respiratorias y, en consecuencia, una disminución del flujo aéreo.

Las células T CD4⁺ juegan un papel fundamental en las distintas etapas de la patología asmática [16]. Estos linfocitos se pueden dividir en varios subtipos, en función de las citocinas que liberan tras su activación, siendo las células T cooperadoras de tipo 2 (Th2), que producen interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13, el principal subtipo implicado en la respuesta asmática [17].

Las respuestas de tipo 2 se activan para combatir infestaciones causadas por parásitos extracelulares, como los helmintos, siendo también el principal mecanismo inmune que interviene en enfermedades inflamatorias de tipo alérgico como el asma, la rinitis alérgica, la dermatitis atópica o la esofagitis eosinofílica [18]. Por esta razón, el asma se considera una enfermedad mediada por una respuesta de tipo Th2, la cual está ligada a alergia y atopia, reacciones de hiperreactividad, respuesta a corticosteroides e inflamación eosinofílica [19].

Esta enfermedad se manifiesta con diferentes fenotipos, entre los cuales los más comunes son el asma alérgica, el asma no alérgica, el asma de inicio tardío, el asma por ejercicio y el asma por obesidad [19-21]. Esta heterogeneidad fenotípica del asma limita el conocimiento de los procesos de la enfermedad, debido a que múltiples mecanismos pueden dar lugar a un mismo fenotipo [22]. Por esta razón, en 2008 se acuñó el término endotipo el cual refleja de forma más fidedigna la heterogeneidad molecular del asma [23,24]. En este contexto, se propusieron dos endotipos principales de asma mediada por una respuesta de tipo Th2: el asma Th2 “alto” y el asma Th2 “bajo” (de los términos en inglés Th2 *high* y Th2 *low*) [25].

La respuesta de tipo 2 se inicia con el reclutamiento de las células dendríticas inmaduras desde la médula ósea hasta el tejido pulmonar, proceso que es dirigido por una serie de quimioatrayentes liberados por el epitelio activado como son el ligando de quimiocina (motivo CC) (CCL) 19, CCL20 y CCL27 [26,27]. Una vez alcanzado el tejido diana, las células dendríticas comienzan a captar antígenos mediante receptores del sistema inmune innato como el receptor tipo Toll (TLR) 4 y los receptores de lectina de tipo-C [28], madurando hasta adquirir la capacidad de célula presentadora de antígeno. Esto lo consiguen gracias a la presencia del factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), IL-4, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), linfopoyetina del estroma tímico (TSLP) [29], IL-25 [30] e IL-33 [31], factores que han sido liberados por las células epiteliales y otras células estructurales y del sistema inmunológico.

Una vez que las células dendríticas captan los antígenos, estos son procesados en pequeños péptidos y presentados en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) al receptor de las células T (TCR) presente en la superficie de dichas células, a la vez que se establecen una serie de señales co-estimuladoras necesarias para la activación completa del linfocito y su diferenciación. Además, para que se complete dicha diferenciación hacia el fenotipo Th2, la sinapsis

Introducción

inmunológica debe realizarse en un entorno con altos niveles de IL-4 e IL-13 [32] y bajos niveles de IL-2 [33], favoreciendo en este caso el balance hacia el fenotipo Th2. Tras la polarización, los linfocitos adquieren su capacidad efectora secretando interleucinas asociadas con la respuesta de tipo 2 como son la IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que junto a otras quimiocinas liberadas por las células epiteliales (CCL11, CCL24 y CCL26) provocan el reclutamiento de nuevas células efectoras al foco inflamatorio (eosinófilos, linfocitos Th2, mastocitos y macrófagos). La Figura 2 es una representación de un modelo simplificado de la respuesta de tipo 2, el cual resume todos estos procesos.

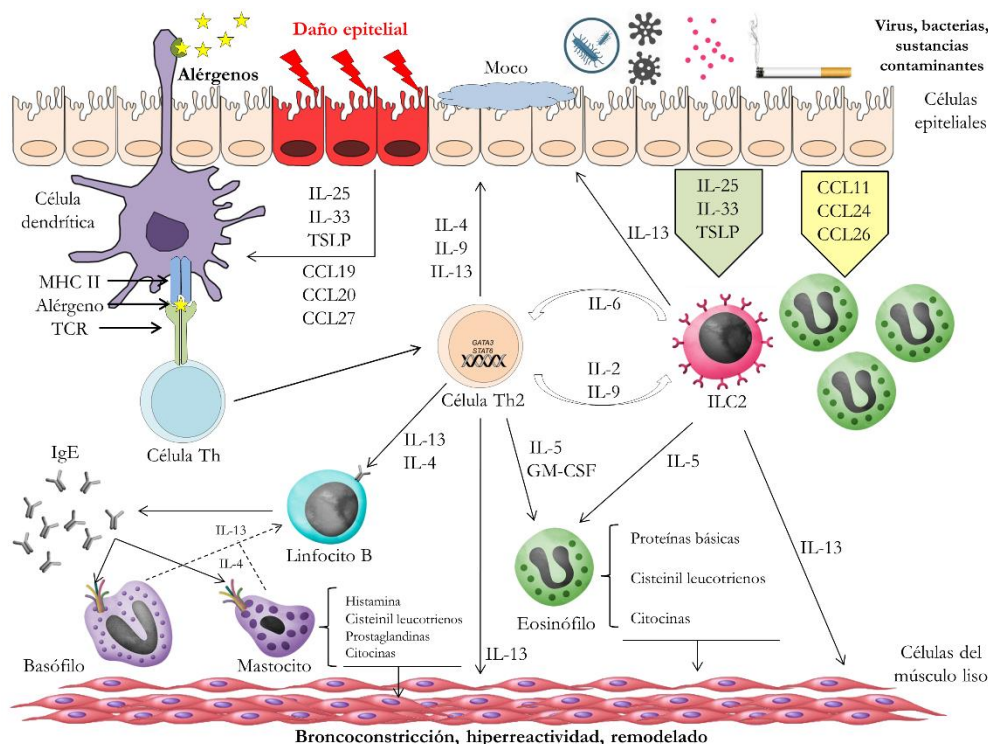


Figura 2. Modelo simplificado de la respuesta Th2 en el asma. En el esquema se representan los componentes innatos y adaptativos que participan en la inflamación alérgica, incluyendo diferentes tipos celulares que liberan citocinas Th2 y quimiocinas en respuesta al daño epitelial. También se muestran las conexiones existentes entre los cambios estructurales en el pulmón y las respuestas inmunes que lo originan. Célula Th, célula T cooperadora; ILC2, célula linfoide innata de tipo 2.

Además de estas células efectoras, existen otros tipos celulares como son las células del músculo liso bronquial y las células epiteliales de las vías respiratorias, que constituyen parte de la estructura del pulmón y se encuentran implicadas en muchos de los procesos característicos de la patología asmática.

1.1.3. Papel del epitelio respiratorio y de la musculatura lisa bronquial en el desarrollo de la patología asmática

Las células Th2 también son capaces de actuar directamente sobre las células epiteliales y musculares de las vías respiratorias a través de la liberación de mediadores inflamatorios (IL-4, IL-9 e IL-13) y estímulos pro-contráctiles [34], induciendo la producción de moco, la metaplasia de las células caliciformes y el aumento de la reactividad de las vías respiratorias. Como consecuencia, se produce

una hipertrofia e hiperplasia de las células del músculo liso de las vías respiratorias, así como un daño en el epitelio respiratorio. Todo esto hace que se liberen diversos factores, los cuales participan activamente en otro proceso característico y muy importante en el asma: el remodelado de las vías respiratorias [35].

El remodelado de las vías respiratorias es un proceso heterogéneo que se inicia con un daño en el epitelio que, a su vez, produce un cambio en el depósito de colágeno en el tejido y de glicoproteínas en la región sub-epitelial y en la matriz extracelular. Esto conduce a una alteración profunda de la estructura de toda la vía aérea con hipertrofia e hiperplasia del músculo liso, aumento e hiperfunción de las células caliciformes y glándulas mucosas, a lo que se suma un proceso de angiogénesis con un incremento, tanto del número como de la permeabilidad, de los vasos sanguíneos [36]. En la Figura 3 se representan los diferentes procesos que ocurren durante el remodelado bronquial.

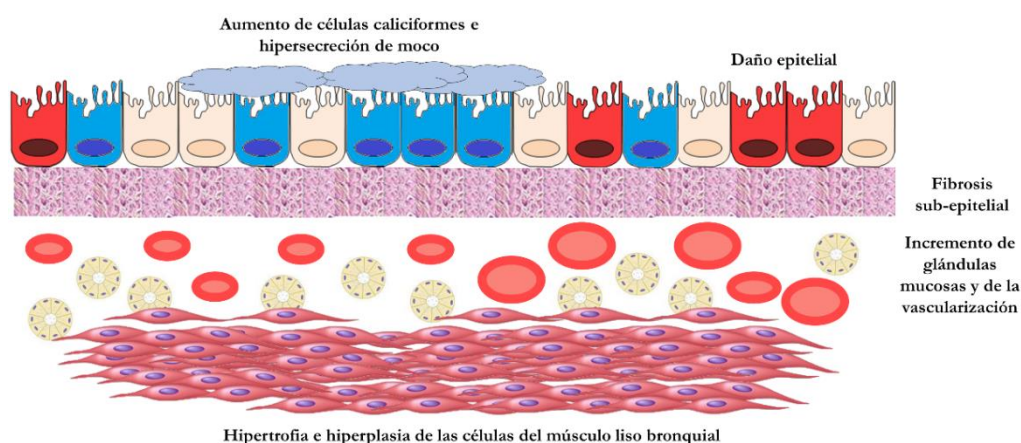


Figura 3. Procesos que ocurren durante el remodelado de las vías respiratorias. El remodelado bronquial incluye diferentes procesos: la deposición de colágeno en la matriz, la neovascularización bronquial, la alteración del epitelio, la hipersecreción de moco y la hiperplasia e hipertrofia de células del músculo liso bronquial.

Así, podríamos definir el remodelado bronquial como la aparición de alteraciones en la estructura de los bronquios que modifican su funcionalidad y se caracteriza por la descamación epitelial, la fibrosis sub-epitelial, el incremento de la musculatura lisa, la disminución de la distancia entre el epitelio y las células del músculo liso, la hiperplasia de las células productoras de moco, la angiogénesis y el desarrollo de edema [37].

El resultado final es un aumento del grosor de las paredes de las vías respiratorias que se hacen menos distensibles, lo que explica su irreversibilidad funcional. A este fenómeno hay que añadir la inflamación de las vías respiratorias, habiéndose demostrado que a mayor grado y duración de esta inflamación mayor será el remodelado y la irreversibilidad del proceso inflamatorio [38].

Las células del músculo liso bronquial constituyen la musculatura de la pared de las vías respiratorias. Durante el desarrollo del asma se produce la hiperplasia de estas células como consecuencia de un incremento en su supervivencia y proliferación. Esto puede estar asociado a anomalías intrínsecas y a interacciones con moléculas inflamatorias [39,40]. Pero estas células no solo actúan como elementos contráctiles, sino que se ha demostrado que las células del músculo liso bronquial

Introducción

pueden participar en el remodelado vascular de las vías respiratorias durante el proceso asmático secretando citocinas, factores de crecimiento (factor de crecimiento del endotelio vascular [VEGF]), proteínas de matriz y otros mediadores pro-inflamatorios [41].

Las células epiteliales también participan en estos procesos de remodelado que se producen durante el desarrollo de la patología asmática, pudiendo liberar diversos factores que podrían tener un papel importante en el inicio de dicho proceso [42].

El epitelio respiratorio constituye la capa interna de los bronquios y de los alveolos, y está en contacto con el lumen. Desempeña un papel esencial en la defensa de los pulmones, funcionando como una primera barrera protectora ante agentes tóxicos y partículas externas del ambiente, que pueden promover el daño epitelial o inducir la broncoconstricción. Esta protección se consigue secretando y manteniendo una delgada película acuosa que protege el tejido respiratorio [43].

El epitelio, aparte de actuar como barrera física, también es capaz de liberar distintas citocinas en respuesta al daño producido como TSLP, IL-25 e IL-33, las cuales inducen la expansión de células Th2 [44,45]. Todos estos procesos promueven la migración de diferentes tipos celulares hacia las vías respiratorias, entre los que se encuentran los eosinófilos [46].

1.2. CÉLULAS EFECTORAS EN EL ASMA: EL EOSINÓFILO

El eosinófilo fue descubierto y descrito por primera vez en 1879 por Paul Ehrlich, aunque no fue hasta 1922 cuando se identificó su participación en procesos patogénicos [47]. Desde entonces, han sido muchos los esfuerzos que se han realizado para entender el papel concreto que juegan los eosinófilos en el asma, así como el efecto de los factores y/o productos liberados por estas células en los diferentes procesos asociados con la patología asmática como la inflamación, el daño tisular y el remodelado de las vías respiratorias [48]. Aunque clásicamente los eosinófilos se han asociado con el mecanismo de defensa frente a infestaciones helmínticas, también se han vinculado a enfermedades alérgicas como el asma y la dermatitis atópica [49].

De todas las células integrantes de la respuesta inmune de tipo 2, los eosinófilos son los más decisivos en la propagación y en el mantenimiento del estado inflamatorio. Su carácter multifuncional los sitúa en muchos escenarios, en su mayoría relacionados con este tipo de respuesta, lo que sugiere un papel importante de estas células en la coordinación de la inmunidad de tipo 2. Previamente, se ha ratificado la función esencial que tienen los eosinófilos en el asma y en el remodelado bronquial [50].

1.2.1. Morfología y características de los eosinófilos

Los eosinófilos son leucocitos polimorfonucleares, de núcleo bilobulado y aproximadamente 8 μm de diámetro, que proceden de progenitores pluripotentes de la médula ósea. Los eosinófilos no tienen capacidad proliferativa (pueden permanecer en la circulación sanguínea entre 18 h [49,51] y 25 h [52]), y se caracterizan por poseer numerosos gránulos citoplasmáticos, como se puede observar en la

Figura 4, con un metabolismo muy activo. Normalmente este tipo celular circula en la sangre en baja proporción, constituyendo entre un 3 y un 6% del total de granulocitos [51].

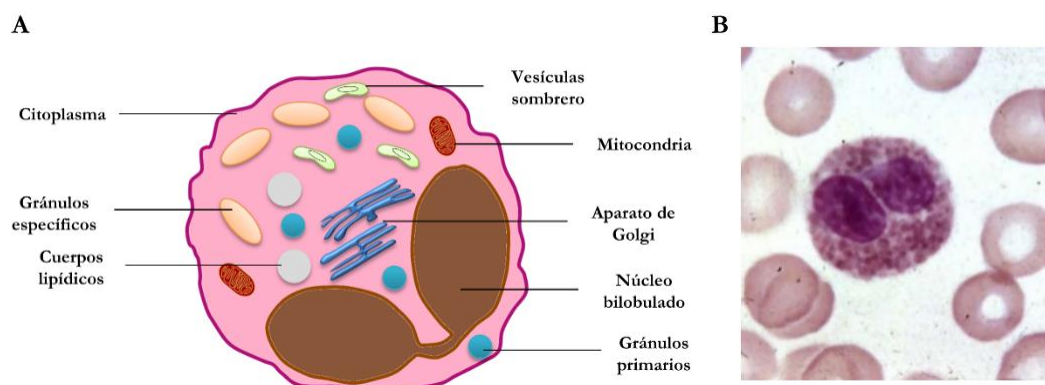


Figura 4. Esquema y fotografía de un eosinófilo de sangre periférica. **A.** Se refleja la gran complejidad a nivel citoplasmático del eosinófilo, el cual posee gran cantidad de gránulos: los gránulos primarios, los gránulos específicos, los cuerpos lipídicos y las vesículas sombrero. El núcleo está formado por dos lóbulos, con una morfología característica. **B.** Frotis sanguíneo teñido con May-Grünwald Giemsa (objetivo de 1000 aumentos). Se observa claramente el núcleo bilobulado característico del eosinófilo.

En la sangre periférica y en los tejidos no inflamados, los eosinófilos se encuentran en estado de reposo; sin embargo, cuando tiene lugar la respuesta inflamatoria se produce la activación de estas células. Esta activación se produce por diferentes moléculas solubles como GM-CSF, IL-3 e IL-5, desencadenando una serie de procesos característicos del eosinófilo como son su migración, adhesión y fagocitosis. Una vez localizado en el área inflamada, se produce la liberación de diferentes factores al medio extracelular.

Los eosinófilos son células multifuncionales involucradas en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, y en la modulación de la respuesta inmune adaptativa y de la inmunidad innata frente a ciertos patógenos [53]. Estas células poseen la capacidad de producir una serie de citocinas inmunorreguladoras que desempeñan funciones de forma activa en la regulación de las respuestas de tipo 2. También son capaces de generar grandes cantidades de leucotrienos como los cisteinil leucotrienos (CysLT) y leucotrienos C₄, los cuales son metabolizados a leucotrienos D₄ y E₄, que están implicados en la inflamación. Los eosinófilos también pueden generar grandes cantidades de factor activador de plaquetas (PAF) y de citocinas como IL-5 y TNF- α [53,54].

En su conjunto, estas características confieren una amplia funcionalidad a los eosinófilos, permitiéndoles participar en la resolución de una infestación por parásitos, considerado como beneficioso para el huésped, o en las enfermedades alérgicas mediadas por hipersensibilidad de tipo 1, en las que el eosinófilo actúa en perjuicio del paciente.

1.2.2. Biogénesis y maduración del eosinófilo

Entre la liberación de los eosinófilos maduros desde la médula ósea hasta el torrente sanguíneo y la posterior infiltración a los tejidos inflamados, tienen lugar una serie de procesos característicos que se esquematizan en la Figura 5 y que a continuación se detallan:

Introducción

1. **Eosinofilopoyesis.** El desarrollo de los eosinófilos en la médula ósea humana suele durar una semana y es estimulado, fundamentalmente, por 3 citocinas: GM-CSF, IL-3 e IL-5. Esta última citocina promueve exclusivamente el desarrollo y diferenciación terminal del eosinófilo, en contraste con las otras dos citocinas (IL-3 y GM-CSF) que, además de estimular el proceso de la eosinofilopoyesis, también son capaces de inducir la activación de otros granulocitos, linfocitos y macrófagos [53-56]. Estas citocinas promueven el desarrollo y maduración de los eosinófilos y producen su liberación desde la médula ósea, a veces ayudadas por otras quimiocinas como la eotaxina. También mantienen la viabilidad de estas células e incrementan las respuestas efectoras de los eosinófilos maduros.
2. **Rodamiento (o *rolling*) y adhesión.** Una vez liberados al torrente circulatorio, los eosinófilos establecen interacciones con el endotelio a través de integrinas llamadas selectinas (L-selectinas y P-selectinas). El anclaje inicial a las células endoteliales y posterior rodamiento por el endotelio, produce la activación de los receptores de estas integrinas aumentando la afinidad por sus ligandos y produciendo una adhesión mucho más firme y estable [52]. Las principales moléculas de adhesión expresadas por los eosinófilos son *cluster* de diferenciación (CD)11b/CD18 (integrinas- β_2) y el antígeno de activación tardía 4 (VLA-4) (integrinas- β_1), las cuales interaccionan con la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión a células vasculares 1 (VCAM-1), respectivamente [47]. Estas interacciones permiten el anclaje del eosinófilo al endotelio y facilitan su extravasación desde el torrente circulatorio hacia los tejidos.
3. **Migración de los eosinófilos.** La trans migración de los eosinófilos desde la circulación hacia los tejidos está regulada por un grupo de proteínas de superficie celular denominadas moléculas de adhesión, previamente mencionadas. Este proceso se caracteriza por el anclaje al endotelio y posterior diapédesis (migración transendotelial), proceso que está controlado por una serie de citocinas y quimiocinas, las cuales facilitan la quimiotaxis (migración dirigida a través de un gradiente de concentración) o la quimiocinesis (movimiento no direccional) [57,58]. Existen ciertas moléculas que tienen capacidad quimiotáctica sobre el eosinófilo como son: eotaxinas, PAF, leucotrienos B₄ y D₄, histamina, citocinas (IL-3, IL-5, GM-CSF) y productos procedentes de la activación del complemento (C3, C5a, C6 y C7) [51].
4. **Activación y eliminación.** Cuando los eosinófilos alcanzan el tejido, la presencia de ciertos estímulos como mediadores lipídicos, citocinas e inmunoglobulinas, activan a los eosinófilos que pueden liberar al espacio extracelular diferentes moléculas y mediadores pro-inflamatorios como citocinas, proteínas granulares y eicosanoides. Además, la presencia de IL-3, IL-5 y GM-CSF, prolonga la supervivencia de los eosinófilos en los tejidos durante tiempos largos (semanas) [59]. De manera natural, estas células son eliminadas por muerte celular programada (apoptosis).

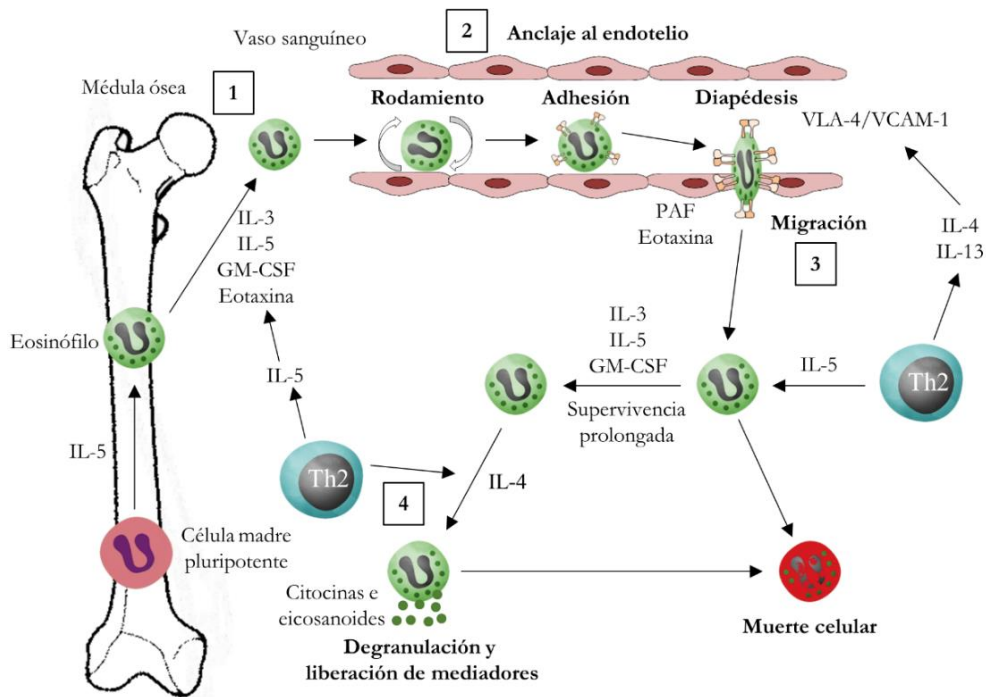


Figura 5. Ciclo de vida del eosinófilo. 1. **Eosinofiloipoyesis.** El eosinófilo maduro se forma a partir de una célula madre pluripotencial en la médula ósea, tras la estimulación con IL-5. Después se libera al torrente circulatorio. 2. **Anclaje al endotelio.** El eosinófilo migra a través del vaso sanguíneo, mediante el rodamiento y adhesión al endotelio. 3. **Migración.** Se produce la diapédesis del eosinófilo hacia el área inflamada debido a la acción de diferentes quimiocinas. Su supervivencia se prolonga por medio de IL-3, IL-5 y GM-CSF. La ausencia de estas citocinas provoca la muerte del eosinófilo. 4. **Degranulación y liberación de mediadores químicos.** Los eosinófilos pueden degranularse y liberar al espacio extracelular diversos factores.

Todos estos procesos mencionados permiten al eosinófilo alcanzar el foco inflamatorio, donde ejercerá sus funciones.

1.2.3. Características celulares y funciones de los eosinófilos

Los eosinófilos tienen diferentes características que promueven la interacción con el ambiente extracelular que les rodea, entre las que se encuentra el hecho de poseer una amplia diversidad de receptores de distinta naturaleza, que permite que su comportamiento sea diferente en función del estímulo. Entre ellos se encuentran receptores de moléculas de adhesión (antígeno asociado a la función de linfocitos 1 [LFA-1], VLA-4, CD44), receptores de citocinas y factores de crecimiento, receptores de mediadores lipídicos (receptores de prostaglandinas y leucotrienos) y receptores de quimiocinas (CCR1, CCR3, C3aR) [60,61]. Estos receptores de superficie celular median múltiples funciones de los eosinófilos, incluyendo la activación, la liberación de mediadores, la degranulación, la adhesión, la quimiotaxis y las interacciones célula-célula [56,62].

Como se ha comentado anteriormente, los eosinófilos son importantes células productoras de citocinas (IL-4, IL-5, IL-10, factor transformante de crecimiento beta [TGF- β]), quimiocinas (CCL5/quimiocina secretada y expresada por linfocitos T normales regulada por activación [RANTES], CCL7/proteína quimiotáctica de monocitos 3 [MCP-3], CCL11/eotaxina-1), factores de crecimiento (VEGF, factor de crecimiento epidérmico [EGF]), proteínas catiónicas (proteína mayor

Introducción

básica [MBP], proteína catiónica del eosinófilo [ECP], neurotoxina derivada del eosinófilo [EDN] y peroxidasa del eosinófilo [EPO]) y enzimas (colagenasa, histaminasa, catalasa, fosfatasa ácida) [60,61]. No sólo son células efectoras, sino que se ha demostrado el papel que los eosinófilos pueden tener como células accesorias presentadoras de antígeno, pudiendo ser esta función una vía de activación de los procesos alérgicos [63]. Pero los eosinófilos no solo juegan este papel, sino que también interactúan con otros tipos celulares (células endoteliales y epiteliales) por medio de selectinas e integrinas, además de modular las funciones de otros leucocitos (mastocitos, macrófagos, células B y células Th2) [60].

Diferentes estudios han demostrado que existen, al menos, cinco mecanismos independientes que permiten al eosinófilo modular la intensidad de la inflamación pulmonar:

1. Pueden actuar como células inmunorreguladoras capaces de generar citocinas pro-inflamatorias [64,65].
2. Los eosinófilos activados generan y liberan cantidades importantes de reactivos intermediarios de oxígeno, como anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo y de nitrógeno, los cuales promueven la inflamación y el daño tisular [66,67].
3. Son capaces de producir lípidos que son mediadores de la inflamación, como los derivados de los CysLT: ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HETE), prostaglandina E₂ (PGE₂), PAF, etc.
4. Secretan una serie de enzimas como la elastasa, la colagenasa o las ribonucleasas, las cuales afectan a la estructura del pulmón.
5. Por último, los eosinófilos liberan las proteínas catiónicas de sus gránulos (MBP, ECP, EPO y EDN), altamente tóxicas para el epitelio pulmonar ya que incrementan la permeabilidad vascular, inducen la contracción de la musculatura lisa de las vías respiratorias y activan a otras células del pulmón [68].

Estas funciones del eosinófilo de carácter efector son desempeñadas a través de diferentes proteínas y mediadores, sintetizados por la propia célula y que son almacenados en gránulos intracelulares. En la Figura 6 se representan los diferentes gránulos citoplasmáticos que posee el eosinófilo y las diferentes moléculas que contienen [49,51], los cuales se clasifican en:

- A. **Primarios.** Se localizan en la membrana y son de tamaño variable. Principalmente contienen la proteína de los cristales de Charcot-Leyden, también llamada galectina-10, la cual constituye el 5-10% de las proteínas eosinofílicas.
- B. **Específicos o secundarios.** En ellos se almacenan, principalmente, cuatro proteínas catiónicas eosinofílicas básicas: MBP, ECP, EDN y EPO. Asimismo, son un reservorio de citocinas, quimiocinas y factores angiogénicos.
- C. **Gránulos pequeños.** Contienen arilsulfatasa B y fosfatasa ácida.
- D. **Cuerpos lipídicos.** Contienen leucotrienos, prostaglandinas y otros mediadores lipídicos.

También se puede encontrar el PAF.

- E. **Vesículas sombrero.** Son gránulos grandes, pleiomórficos y vesiculotubulares, responsables del movimiento de proteínas entre los gránulos y la membrana plasmática. Representan una vía de transporte alternativa de los productos granulares hacia la membrana plasmática para su posterior liberación [69-71].

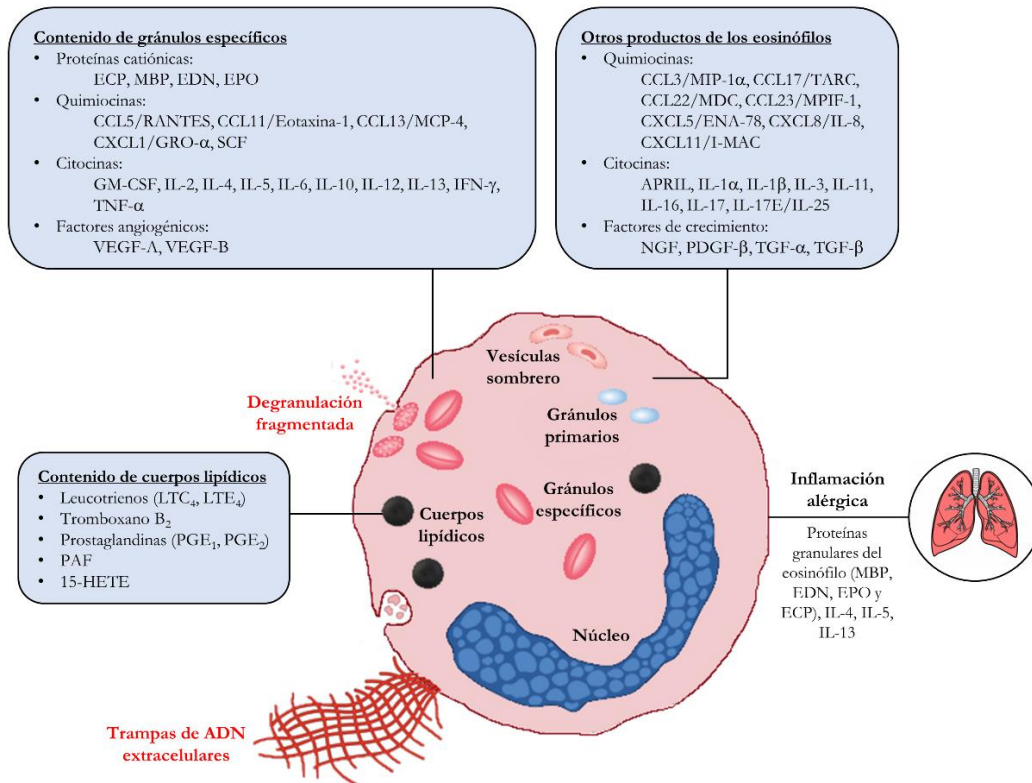


Figura 6. Características del eosinófilo. Los eosinófilos contienen una serie de proteínas y enzimas que le permiten interactuar con el ambiente que le rodea. En estas interacciones, los eosinófilos liberan el contenido de sus gránulos al exterior en respuesta a estímulos externos. Esquema modificado de Varricchi *et al.* [61]. APRIL, ligando inductor de la proliferación; CXCL, ligando de quimiocina (motivo CXC); LT, leucotrieno; NGF, factor de crecimiento nervioso; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; PG, prostaglandina; SCF, factor de célula madre.

Los cristales de Charcot-Leyden, la MBP y la ECP son los principales marcadores de los eosinófilos [53]. Además, este tipo celular puede producir mediadores lipídicos a partir de los fosfolípidos de membrana, como son los CysLT.

1.2.4. Degranulación de los eosinófilos

Uno de los procesos característicos de los eosinófilos es su degranulación, a través de la cual liberan el contenido de sus gránulos al espacio extracelular. Esta degranulación se puede hacer por diversos mecanismos [72], que se esquematizan en la Figura 7 y se detallan a continuación:

1. **Exocitosis.** Este mecanismo se divide en dos subtipos: exocitosis clásica y exocitosis compuesta. La fusión de los gránulos intracelulares con la membrana plasmática produce la liberación de su contenido (exocitosis clásica). En casos más extremos se puede producir la exocitosis compuesta, en la cual varios gránulos citoplasmáticos se fusionan entre sí

previamente a la unión con la membrana plasmática. Aunque este tipo de liberación se ha observado en la interacción con parásitos, no suele ser muy común en otros escenarios donde actúa el eosinófilo.

2. **Degranulación fragmentada (*piecemeal degranulation*).** Mecanismo a través del cual se produce el empaquetamiento del contenido de los gránulos en pequeñas vesículas secretoras, que serán transportadas hacia la superficie celular para unirse con la membrana plasmática y liberar su contenido al exterior celular. A estas vesículas se las conoce como vesículas sombrero [70]. Es un mecanismo cuidadosamente regulado y es el más observado en numerosos procesos fisiológicos [71,73,74]. Se desencadena como respuesta a un estímulo determinado, como citocinas (interferón gamma [IFN- γ]) y quimiocinas (eotaxina). Una vez se ha liberado el contenido granular, el eosinófilo sigue siendo viable y puede responder completamente a cualquier estímulo que reciba posteriormente. Este mecanismo también se ha descrito en mastocitos y basófilos [75].
3. **Degranulación citolítica.** Se produce la liberación de los gránulos intracelulares intactos a través de un modo característico de muerte celular denominado citolisis. Este tipo de muerte celular es morfológicamente distinta a la apoptosis y a la necrosis, ya que estos eosinófilos citolíticos se caracterizan por la disgregación de la membrana nuclear y la descondensación de ADN en el citoplasma [72]. Este tipo de liberación se produce como respuesta ante un estímulo citolítico y puede estar asociado o no a la liberación de trampas de ADN [76]. Este mecanismo de degranulación provoca la muerte del eosinófilo.

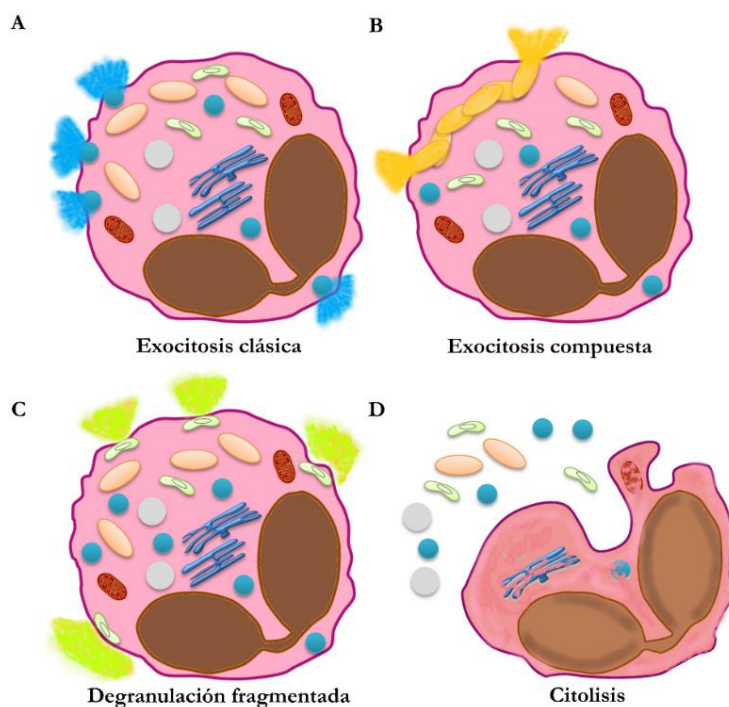


Figura 7. Mecanismos de degranulación de los eosinófilos. **A.** Exocitosis clásica: fusión de los gránulos con la membrana plasmática y liberación de su contenido. **B.** Exocitosis compuesta: fusión previa entre los gránulos antes de la liberación al espacio extracelular. **C.** Degranulación fragmentada: transporte vesicular de pequeños paquetes del material granular hacia la superficie celular. **D.** Citolisis: depósito extracelular de los gránulos intactos tras la lisis celular.

El mecanismo principal de degranulación de los eosinófilos en enfermedades alérgicas e inflamatorias es la degranulación fragmentada. También se ha descrito que los eosinófilos pueden degranularse mediante citolisis, aunque lo hacen en menor proporción [77,78].

Debido a los numerosos gránulos intracelulares que tienen los eosinófilos y la manera regulada que tienen de secretarlos al espacio extracelular, es posible que alguno de ellos se corresponda con endosomas y cuerpos multivesiculares característicos de la biogénesis de exosomas (nanovesículas extracelulares implicadas en la comunicación intercelular). Aunque la capacidad de sintetizar y liberar exosomas al medio ha sido descrita en diferentes tipos celulares, como los linfocitos T o las células dendríticas [79,80], esta propiedad nunca antes se ha demostrado en los eosinófilos, principal célula efectora en el asma.

1.3. EXOSOMAS: BIOGÉNESIS, MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN EN EL ASMA

En el organismo, las células están expuestas a diferentes condiciones adversas, incluyendo el estrés físico, el calor y los agentes químicos, lo que contribuye al daño celular. Debido a estos estímulos externos, las células son capaces de interactuar con otras células localizadas en diferentes lugares. La comunicación célula-célula permite la coordinación de las funciones celulares, lo que es importante en el desarrollo y adaptación al ambiente de organismos multicelulares y, en última instancia, para el mantenimiento de la homeostasis. Existen distintas maneras de comunicación intercelular las cuales involucran el intercambio de factores solubles (citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, neurotransmisores) y de material genético [81]. Esta transmisión de información puede tener lugar mediante diferentes vías, siendo una de ellas los exosomas, cuyo estudio se ha visto incrementado de forma exponencial durante la última década.

Los exosomas son pequeñas vesículas lipídicas (nanovesículas), de entre 30-100 nm de diámetro, que son secretadas al medio extracelular desempeñando un papel importante en la comunicación intercelular [82]. Una vez en el medio extracelular, los exosomas pueden ser captados por células vecinas o por células localizadas en otras partes del organismo, después de ser transportados por el torrente circulatorio. Esto puede provocar cambios en la célula receptora debido a la liberación de su contenido (lípidos bioactivos, proteínas y ácidos nucleicos como ARN mensajero [ARNm] y microARN [miARN]) [81,83].

El término exosoma suele ser empleado comúnmente y utilizado de forma universal para definir a nanovesículas liberadas por la célula e implicadas en la comunicación intercelular. Sin embargo, esto no es del todo correcto, pues existen diferentes vesículas extracelulares que es necesario diferenciar [84]:

- A. **Exosoma.** Se refiere a nanovesículas de entre 30-100 nm de diámetro cuyo origen es endosomal.

- B. **Microvesículas o ectosomas.** Tienen entre 50-1000 nm de diámetro, pero se originan directamente de la membrana plasmática.
- C. **Cuerpos apoptóticos.** Su diámetro es de 50-5000 nm y son liberados por células que están en procesos de muerte celular.

1.3.1. Biogénesis de los exosomas

La vía endocítica o endolisosomal está constituida por una serie de compartimentos de membrana altamente dinámicos e involucrados en la internalización de ligandos extracelulares o componentes celulares, en el reciclaje de la membrana plasmática y/o en su degradación [85,86]. Los endosomas tempranos ($CD63^+$) maduran dando lugar a endosomas tardíos [87], y durante este proceso se generan vesículas intraluminales (ILV) ricas en su interior en ácido lisobisfosfatídico (LBPA) [88]. Estas ILV están formadas por invaginaciones de la membrana limitante del endosoma temprano, las cuales contienen proteínas, lípidos y citosol, siendo estas invaginaciones específicamente clasificadas. Los endosomas tardíos maduran y se transforman en cuerpos multivesiculares (MVB) maduros ($CD63^+/LBPA^+$), denominados así por sus características morfológicas [88]. En la mayoría de las células, el destino principal de los MVB es la fusión con los lisosomas, compartimentos ácidos que contienen hidrolasas lisosómicas, asegurando la degradación de su contenido. Alternativamente, estos MVB también pueden fusionarse con la membrana plasmática liberando su contenido al medio extracelular en forma de exosomas [89]. En la Figura 8 se esquematizan estos procesos.

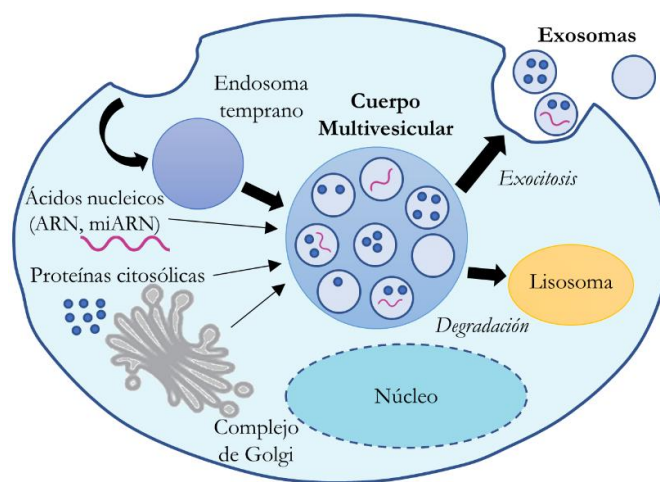


Figura 8. Biogénesis de los exosomas. Durante el proceso de maduración de los endosomas tempranos a endosomas tardíos, se forman unas invaginaciones a partir de la membrana del endosoma temprano hacia el interior del lumen, formando las vesículas intraluminales (ILV). Debido a las características morfológicas que adquieren estos endosomas tardíos, se denominan cuerpos multivesiculares. Los MVB pueden fusionarse con los lisosomas para la degradación de su contenido o con la membrana plasmática para liberar las ILV al espacio extracelular en forma de exosomas.

El mecanismo mejor descrito para la formación de ILV y MVB es el impulsado por el complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT), que se compone de aproximadamente treinta proteínas agrupadas en cuatro complejos: ESCRT-0, -I, -II y -III [90]. Existen varias proteínas asociadas a estos complejos, como la proteína vacuolar de clasificación 4 (VPS4), proteína homóloga

de VTA1 asociada a la proteína de clasificación vacuolar (VTA1), proteína 6 de interacción en la muerte programada (PDCD6IP o ALIX), proteína del gen 101 de susceptibilidad tumoral (TSG101), CD63 y la proteína de choque térmico (HSP) 70, las cuales se han postulado como marcadores exosomales [82]. Sin embargo, también se han descrito mecanismos independientes de ESCRT en la formación de ILV y MVB [91].

Existen diferentes marcadores específicos de MVB que también se localizan en los exosomas, confirmando su origen endosomal, como la tetraspanina CD63, las proteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMP) 1 y LAMP2, moléculas procedentes del complejo de Golgi (por ejemplo, las proteínas Rab) y otras proteínas asociadas al proceso de biogénesis de los exosomas como ALIX y TSG101 [92].

1.3.2. Morfología y función de los exosomas

Los exosomas poseen diferentes moléculas de superficie (CD9, CD54, CD63, CD81, CD82, antígeno leucocitario humano [HLA]-DR) que son una combinación de moléculas de adhesión, tetraspaninas, integrinas, moléculas co-estimuladoras y moléculas características de su origen endosomal (TSG101, ALIX), así como otras proteínas que se localizan en el interior de los exosomas (Rab-GTPasas, LAMP1, HSP) [93-95].

En la Figura 9 se representa un esquema de la estructura, morfología y composición molecular de un exosoma.

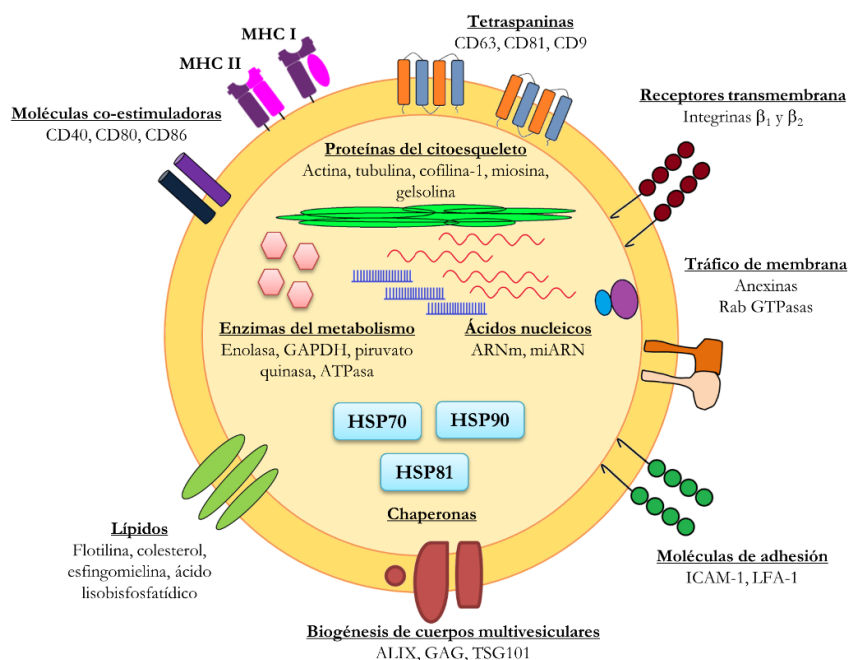


Figura 9. Estructura morfológica y molecular del exosoma. Todos los exosomas contienen proteínas involucradas en el transporte a través de la membrana y fusión (proteínas Rab GTPasas, anexinas), proteínas del citoesqueleto, moléculas de adhesión y tetraspaninas. También pueden contener ácidos nucleicos, principalmente miARN. GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; GAG, antígeno específico de grupo; MHC I, complejo mayor de histocompatibilidad de clase I.

Desde hace unos años, los exosomas son reconocidos por ser importantes mediadores en la

Introducción

comunicación célula-célula en muchos procesos fisiológicos y patológicos [96], pudiendo ser liberados por diferentes tipos celulares como son los reticulocitos, los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos [81]. Además, se pueden encontrar en diferentes fluidos biológicos, como el suero, leche materna, lavado broncoalveolar y orina [97].

Los exosomas no solo son necesarios para el funcionamiento celular normal y la regulación de la homeostasis en órganos y tejidos [98-100], sino que también están implicados en diferentes patologías inflamatorias como enfermedades cardiovasculares [101] y cáncer [102]. En el contexto de las enfermedades respiratorias, los exosomas podrían estar jugando un papel esencial en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y en el asma [103,104], aunque todavía no se conocen bien la mayoría de los mecanismos de actuación. Algunos investigadores han descrito la participación de los exosomas en la respuesta inmune, siendo capaces de actuar como unidades presentadoras de antígeno, estimulando a linfocitos T e induciendo la producción de citocinas pro-inflamatorias [105].

Además, los exosomas contienen en su interior miARN, los cuales podrían regular diferentes funciones celulares contribuyendo, de alguna manera, al desarrollo de la patología asmática debido a la alteración de su expresión en los individuos enfermos [106].

1.4. MICROARN: BIOGÉNESIS Y FUNCIÓN

Hace más de 20 años, Rosalind C. Lee *et al.* establecieron los pilares del conocimiento sobre nuevos mecanismos de la regulación génica: el gen *LIN4* que controla el desarrollo larval de *C. elegans* no codifica ninguna proteína, sino que es capaz de producir dos pequeños ARN [107]. A partir de este descubrimiento, se realizaron numerosos estudios para caracterizar estos pequeños ARN en otras especies [108-110], los cuales se denominaron miARN.

Los miARN son pequeños ARN no codificantes, de cadena sencilla y de aproximadamente 19-25 nucleótidos de longitud. Se encuentran en la mayoría de las células y organismos eucariotas, incluidos los mamíferos, hongos y plantas. Su función principal es la regulación génica ya que en su estado maduro se unen al ARNm reprimiendo su traducción, modulando con ello diferentes procesos como la diferenciación celular, la proliferación y la supervivencia [111]. Los miARN poseen una característica que les confiere una gran versatilidad, ya que un miARN no es específico de un único gen, sino que es capaz de actuar sobre varios genes y, en consecuencia, sobre múltiples rutas y vías génicas, lo que conlleva una amplificación de su actuación [112,113]. Actualmente, existen más de 2.500 registros de miARN maduros en humanos, lo que hace que la versatilidad y el potencial de regulación génica sea enorme [114].

1.4.1. Biogénesis de los miARN

La transcripción de los miARN se encuentra regulada, principalmente, por la ARN polimerasa (ARN Pol) II, aunque un grupo minoritario puede ser transcrito por la ARN Pol III [115,116].

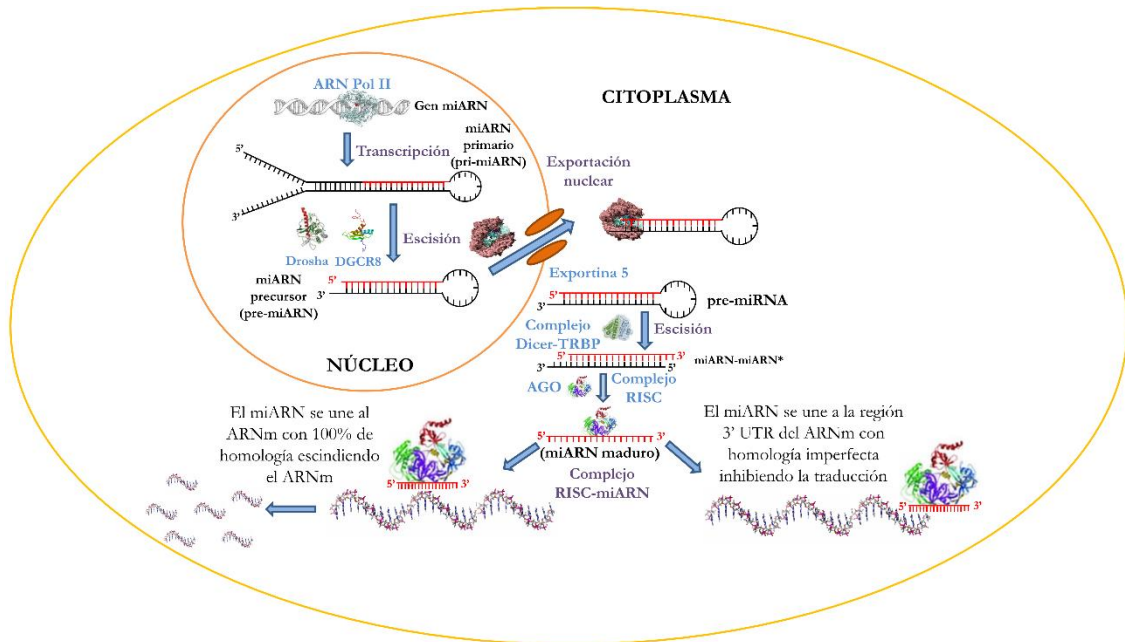


Figura 10. Biogénesis de los miARN. La biogénesis de los miARN comienza con la transcripción del pri-miARN por la ARN Pol II. El pri-miARN es escindido por el complejo microprocesador Droscha/DGCR8 para generar el pre-miARN, el cual es transportado al citoplasma mediante el complejo EXP5. Allí es procesado por el complejo Dicer-TRBP para generar el dúplex miARN-miARN*. El miARN maduro se incorpora al complejo RISC, para unirse posteriormente con el ARNm y regular su expresión. TRBP, proteína TAR de unión a ARN; UTR, región no traducida del ARNm.

La biogénesis de los miARN se puede dividir en una serie de fases que se esquematizan en la Figura 10 y que a continuación se detallan:

1. **Procesamiento nuclear.** Los transcritos primarios generados por la ARN Pol II (microARN primario [pri-miARN]) tienen varias Kb de longitud y una estructura en forma de horquilla. El primer paso en la maduración es la escisión de los extremos 5' y 3' no apareados que no forman la estructura en horquilla, por medio de una ARNasa nuclear (endorribonucleasa) de tipo III llamada Droscha [115,117]. El producto procedente de la escisión por Droscha tiene aproximadamente 70 nucleótidos, constituyendo el transcrito precursor del miARN (pre-miARN). La enzima Droscha necesita la subunidad DGCR8 del complejo microprocesador (DGCR8), el cual ayuda a que la horquilla esté posicionada correctamente. Todos estos procesos tienen lugar en el núcleo.
2. **Transporte por exportina 5.** Después del procesamiento nuclear, los pre-miARN son exportados al citoplasma por medio de un receptor de transporte nuclear conocido como exportina 5 (EXP5), el cual reconoce los extremos terminales del pre-miARN [118] y lo exporta al citoplasma por medio de un poro nuclear [119-122].
3. **Procesamiento por la endorribonucleasa Dicer (Dicer).** Tras la movilización del pre-miARN al citoplasma, este es procesado por la enzima Dicer (endorribonucleasa de tipo III) [123], escindiendo el pre-miARN cerca de la región de la horquilla y liberando el dúplex de ARN de doble cadena miARN-miARN*, de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud [124,125]. Este dúplex consiste en dos cadenas fosforiladas en 5' y con extremos 3'

protuberantes, siendo una de ellas la cadena guía (5'→3', miARN) y la cadena complementaria es la cadena pasajera (miARN*).

4. **Formación del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).** El dúplex miARN-miARN* es cargado a la proteína argonauta (AGO) para generar el complejo efector llamado RISC. En ese momento y ubicación es cuando tiene lugar la separación de las cadenas de ARN: una de ellas se quedará junto a la proteína AGO como la cadena guía (5'→3') o miARN maduro (miARN), mientras que la cadena pasajera (miARN*) será degradada [126]. El complejo RISC junto con el miARN (complejo miRISC), tendrá una función de silenciamiento post-transcripcional, regulando la expresión génica por el apareamiento directo con el ARNm, de tal manera que si el apareamiento de bases es total se produce la degradación del ARNm (proceso que suele ser exclusivo de plantas), mientras que si el apareamiento de bases es parcial solo se produce el bloqueo de la traducción [127].

El control de los niveles de expresión de los miARN es esencial para mantener las funciones celulares normales, ya que una alteración en la expresión de los miARN está asociado a una expresión génica aberrante que puede desencadenar la condición patológica [128].

1.4.2. Función y mecanismo de los miARN

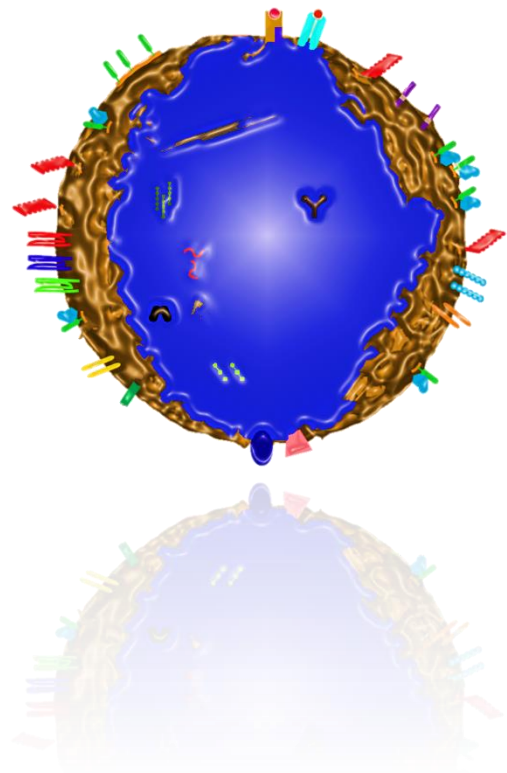
Los miARN se localizan por todo el organismo regulando la expresión génica, tanto en la célula de origen (actuación autocrina) como en otras células de localización más lejana, ejerciendo una regulación de tipo paracrina. Se ha comprobado que la mayoría de los miARN detectables en suero y en saliva están contenidos en el interior de los exosomas [129]. Pero los miARN no solo se encuentran dentro de los exosomas, sino que la propia célula posee una gran cantidad de miARN implicados en la regulación génica del transcriptoma celular. Actualmente, el estudio de los miARN es un área de estudio en expansión, ya que son considerados biomarcadores no invasivos en diferentes patologías, como puede ser el cáncer, la hepatitis o diferentes alergias y enfermedades inflamatorias [130].

El principal mecanismo involucrado en el control de la expresión génica es la regulación génica post-transcripcional mediante la hibridación miARN-ARNm, dando lugar al silenciamiento o sub-regulación génica. Existen 6-8 nucleótidos en la región 5' del miARN (conocida como “secuencia semilla”) que son responsables de la especificidad de unión al ARNm diana. El miARN interactúa con el ARNm mediante un apareamiento Watson-Crick, y el grado de apareamiento determina el silenciamiento producido: el apareamiento total de los nucleótidos produce la degradación del ARNm, mientras que un apareamiento de menor nivel provoca la represión de la traducción [128].

En el contexto de las enfermedades pulmonares, los miARN han sido ampliamente estudiados, ya que una de las ventajas que existe es que el pulmón tiene un perfil de expresión de miARN único y bastante conservado [131]. Entre los miARN ligados a la patología asmática, uno de los mejor

descritos es el miR-21 que suele encontrarse sobre-expresado en células epiteliales de pacientes asmáticos [132]. Este miARN está implicado en la regulación de los niveles de IL-12 (citocina que promueve la respuesta de las células T cooperadoras de tipo 1 [Th1]), reprimiendo su expresión y permitiendo que el balance Th1/Th2 se modifique hacia una respuesta Th2 [133,134].

Un conocimiento más profundo sobre los distintos mecanismos y procesos que intervienen en el desarrollo de la patología asmática, así como un estudio más detallado del papel que desempeñan los exosomas y la forma de actuación específica de los miARN en dicha enfermedad, pueden ofrecer cambios fundamentales en el desarrollo de terapias o definición de biomarcadores. Esto permitiría un mejor diagnóstico y tratamiento para enfermedades multifactoriales y complejas como es el caso de la patología asmática [135].

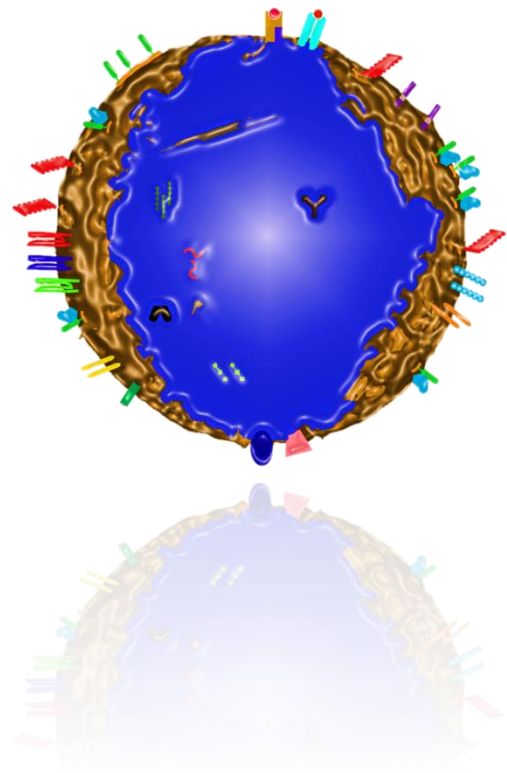


2. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis es demostrar la capacidad de los eosinófilos circulantes de producir y liberar exosomas al exterior celular y definir su posible papel en los procesos que caracterizan a la patología asmática.

El objetivo general planteado se ha desarrollado en los siguientes objetivos parciales:

1. Estudiar la liberación de exosomas al medio extracelular por parte de los eosinófilos purificados de sangre periférica procedentes de dos poblaciones diferentes: donantes sanos y pacientes asmáticos.
2. Caracterizar los exosomas desde el punto de vista morfológico y molecular.
3. Analizar la funcionalidad y los mecanismos de actuación de dichos exosomas sobre las principales células efectoras del asma: los eosinófilos (regulación autocrina).
4. Evaluar los efectos que ejercen estos exosomas sobre las células estructurales del pulmón implicadas en la patología asmática: células epiteliales de vías respiratorias pequeñas y células del músculo liso bronquial.
5. Búsqueda de un perfil diferencial de miARN de eosinófilos entre las condiciones asma y sano.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. SELECCIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO

La investigación se realizó en dos grupos de estudio: sujetos asmáticos y una población sana control. El reclutamiento de los pacientes asmáticos se realizó en los Servicios de Alergología de diferentes hospitales de la Comunidad de Madrid: Fundación Jiménez Díaz-Quirón Salud y Hospital Universitario La Paz. Los individuos sanos que participaron en el estudio se reclutaron entre el personal de investigación perteneciente al Grupo de Alergia e Inmunología del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD).

La selección de los sujetos de estudio se estableció de acuerdo a una serie de criterios de inclusión que se detallan a continuación para cada grupo de individuos:

- **Individuos sanos:** individuos preferentemente no fumadores y sin antecedentes de asma, enfermedad alérgica u otra patología respiratoria.
- **Individuos asmáticos:** pacientes con una historia clínica consistente y evidencias objetivas de asma durante, al menos, 6 meses de duración, siguiendo los criterios establecidos por la Guía Española Para El Manejo Del Asma (GEMA 4.0) [136]:
 - ❖ Estos individuos mostraron una mejoría, superior al 12%, en el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁) a los 15 min tras la administración de 400 µg de salbutamol o terbutalina inhalada.
 - ❖ Tuvieron una prueba de metacolina positiva (PC₂₀ inferior a 16 mg/mL), lo cual es indicativo de hiperreactividad de las vías respiratorias.
 - ❖ Dichos sujetos tenían un grado leve, moderado o grave de la enfermedad durante, al menos, 6 meses de duración, siendo clínicamente estables.
 - ❖ Ninguno de ellos tuvo episodios de infección en el tracto respiratorio durante, al menos, 6 meses antes de su inclusión en el estudio.
 - ❖ Se incluyeron pacientes atópicos y no atópicos en el grupo de los asmáticos, debido a que no existen diferencias en los parámetros analizados para ambos grupos de pacientes, como previamente se ha observado.
 - ❖ Para los pacientes que reciben corticosteroides inhalados como tratamiento, los medicamentos fueron suspendidos, como mínimo, durante dos semanas antes de la extracción de sangre. Ningún paciente recibió corticosteroides orales (en los últimos 6 meses previos al estudio), antagonistas de receptores de leucotrienos, aspirina u otro inhibidor de ciclooxigenasas (COX).

3.2. CONSIDERACIONES ÉTICAS DEL ESTUDIO

La obtención de muestras biológicas (sangre periférica) se llevó a cabo tras la firma del consentimiento informado por parte de todos los individuos integrantes del estudio. La hoja de

información al paciente explica a los sujetos participantes en qué consiste dicho estudio, que cumple con los principios de la Declaración de Helsinki, tal y como establece la legislación vigente, y que cuenta con la aprobación previa del Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC) del IIS-FJD.

3.3. PURIFICACIÓN DE EOSINÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Tras la extracción de las muestras de sangre periférica (50 mL) en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante (BD Vacutainer®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos), se realizó la purificación de los eosinófilos y de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), mediante un procedimiento que consta de dos pasos, previamente descrito [137]. Previo al fraccionamiento de la sangre, esta se diluyó con solución salina 0,9% (Braun, Melsungen, Alemania) en una proporción 1:1.

En un primer paso, las distintas fracciones celulares se separaron por centrifugación diferencial en gradiente de densidad con una solución de aislamiento de linfocitos (*Lymphoprep*, Comercial Rafer SL, Zaragoza, España), como se puede observar en la Figura 11. Se realizó una proporción 5:3 de sangre diluida y *Lymphoprep*. La fracción de células mononucleares se lavó dos veces con solución salina 0,9% (Braun) y se resuspendió en medio de congelación, compuesto por RPMI-1640 (Lonza, Basilea, Suiza) con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), guardándose 24-48 h a -80°C, tras lo cual se almacenaron definitivamente en nitrógeno líquido. El proceso de purificación de eosinófilos continuó con la eliminación de los eritrocitos de la fracción polimorfonuclear, para lo que se utilizó solución de lisis (NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5).

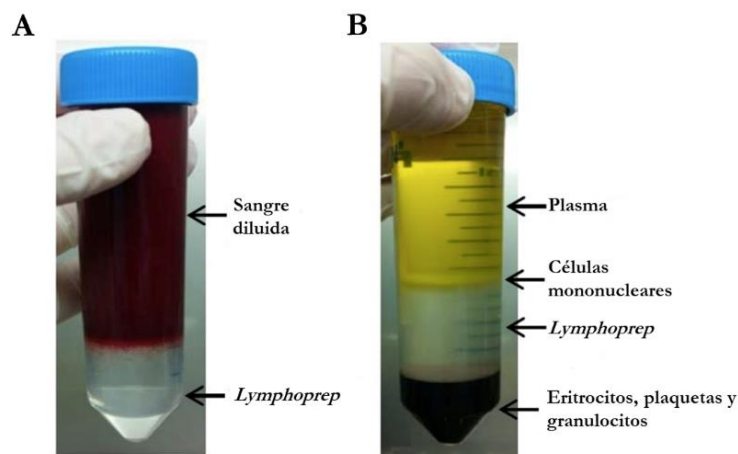


Figura 11. Fraccionamiento de sangre completa por gradiente de densidad. A. Previo a la centrifugación, la sangre diluida y el *Lymphoprep* quedan separados. **B.** Después de la centrifugación la sangre se divide en diferentes fases o capas, comprendiendo la capa de plasma, células mononucleares, *Lymphoprep* y la capa de células rojas y granulocitos (células polimorfonucleares).

En un segundo paso, se eliminaron las células residuales de la fracción polimorfonuclear utilizando el kit de purificación *EasySep*® (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), siguiendo las instrucciones del fabricante, el cual contiene un cóctel de anticuerpos frente a diversos marcadores

de superficie: CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD123 y glicoforina A. El método elegido en la purificación de los eosinófilos se basa en la inmunoselección negativa, según se representa en la Figura 12, ya que los eosinófilos no tienen ninguno de los marcadores de superficie anteriormente reseñados.

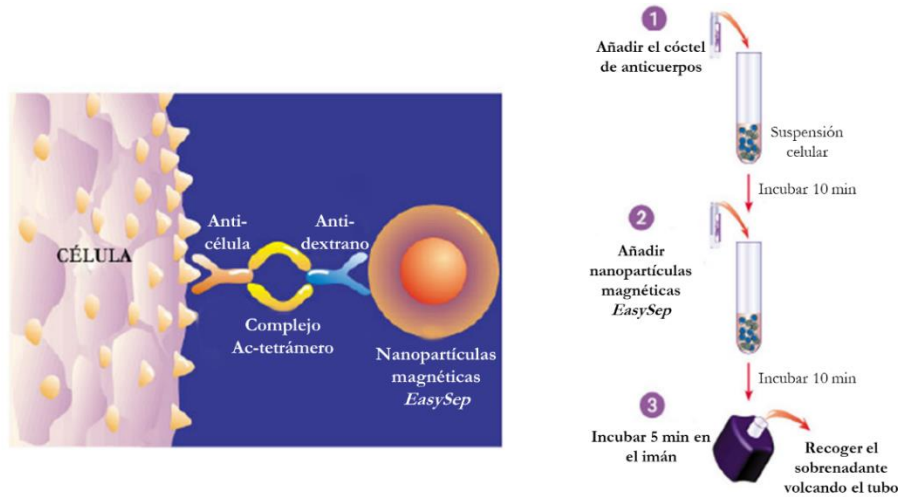


Figura 12. Esquema del protocolo de purificación de eosinófilos por inmunoselección negativa, mediante el uso de nanopartículas magnéticas. Modificado del protocolo proporcionado con el producto por EasySep® (StemCell Technologies).

La evaluación de la viabilidad de las células obtenidas y el conteo de las mismas se realizó en la cámara de Neubauer, mediante la tinción con azul tripán (Sigma-Aldrich, Merck KGaA), mientras que para la determinación del número de eosinófilos purificados se utilizó la cámara de Fuchs-Rosenthal, previa tinción con el colorante de basófilos (0,05% azul de toluidina, 0,85% NaCl, etanol 95% y saponina). Para evaluar el rendimiento del proceso y el grado de purificación de los eosinófilos obtenidos, dichas células se marcaron con dos anticuerpos conjugados con distintos fluorocromos: anti-lectina de tipo inmunoglobulina de unión a ácido siálico 8 (SIGLEC8) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (MACS, Miltenyi Biotec, Bergis Gladbach, Alemania) y anti-CD16 conjugado con ficoeritrina (PE) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos). Posteriormente, la muestra se analizó en el citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences). La pureza obtenida de rutina fue superior al 96%, la cual se corresponde con el porcentaje de células SIGLEC8-FITC⁺/CD16-PE⁻.

3.4. CULTIVOS CELULARES

3.4.1. Cultivo de eosinófilos

Los eosinófilos purificados de sangre periférica, tanto de pacientes asmáticos como de individuos sanos, se ajustaron a una concentración celular de 1×10^6 células/mL en medio RPMI-1640 sin rojo fenol (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) suplementado con: suero bovino fetal inactivado (STFi) 10%, al cual se le habían eliminado previamente los exosomas por ultracentrifugación y posterior filtrado con filtros de 0,22 μ m de poro (Merck Millipore, Merck

Materiales y Métodos

KGaA), 0,1 nmol/L de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 10 nmol/L de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico (HEPES) y 2 nmol/L de L-glutamina, todo ello proporcionado por la casa comercial Lonza. El medio de cultivo se suplementó con una combinación de estímulos: IL-5 (5 ng/mL) y GM-CSF (10 ng/mL) (R&D Systems, Bio-Techne, McKinley, MN, Estados Unidos), excepto en algunos ensayos específicos donde no se añadieron dichos estímulos. Los eosinófilos se cultivaron en placas de 24 pocillos (Corning®, Corning, NY, Estados Unidos) y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ a diferentes tiempos: 90 min, 2 h o 24 h, dependiendo del tipo de ensayo realizado. En todos los experimentos, los eosinófilos se utilizaron a una concentración celular de 1 x 10⁶ células/mL.

En ciertos experimentos (análisis de miARN), inmediatamente después de la purificación, los eosinófilos procedentes de individuos sanos y de pacientes asmáticos se lavaron con PBS 1X, se resuspendieron en 700 µL de QIAzol (Qiagen, Hilden, Alemania) y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

3.4.2. Cultivo de células epiteliales de vías respiratorias pequeñas (SAEC)

El medio de cultivo que se utilizó para el crecimiento de este tipo celular fue el *SAGM BulletKit Medium* (Lonza), el cual contiene el medio basal (*SABM*) y los siguientes estímulos, los cuales se añadieron al medio en las concentraciones indicadas por el fabricante:

- Extracto de pituitaria bovina.
- Hidrocortisona.
- Factor de crecimiento epidérmico humano.
- Epinefrina.
- Transferrina.
- Insulina.
- Ácido Retinoico.
- Triyodotironina.
- Antibióticos: gentamicina/anfotericina-B.
- Albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos.

Para la realización de los experimentos fue necesario que las SAEC (Lonza) estuvieran en el tercer pase de crecimiento. Por ello las células se cultivaron siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

Inicialmente las células se crecieron en *flask* de 75 cm² (Corning®), a una concentración de 2.500 células/cm² y con un volumen de medio de cultivo de 1 mL/5 cm². Cuando las células llegaron a una confluencia del 80%, se despegaron del *flask* con 6 mL de tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich, Merck KGaA), previo lavado con 20 mL de PBS 1X estéril. Para inactivar la tripsina se añadieron 12 mL de

solución de neutralización de la tripsina (Lonza). Posteriormente, se recogió todo el volumen y se centrifugó a 220 g durante 5 min a 22°C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en 2-3 mL de medio de cultivo. A continuación, se realizó el recuento de células y la evaluación de la viabilidad de la muestra, mediante la tinción con azul tripán (Sigma-Aldrich, Merck KGaA) y conteo en la cámara de Neubauer, para volver a cultivarlas a una concentración de partida de 2.500 células/cm². Este cultivo se realizó en *flask* de 75 cm² (si el propósito era continuar con el crecimiento de células) o en placas de cultivo (si el objetivo era utilizarlas para iniciar los diferentes experimentos). En ambos casos, las células se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

3.4.3. Cultivo de células del músculo liso bronquial (BSMC)

El medio de cultivo idóneo utilizado para este tipo celular fue el *SmGM-2 BulletKit* (Lonza), que contiene el medio basal (*SmBM*) y los siguientes reactivos, que fueron añadidos siguiendo las recomendaciones de la casa comercial:

- Factor de crecimiento epidérmico humano.
- Insulina.
- Factor de crecimiento de fibroblastos humanos.
- Antibióticos: gentamicina/anfotericina-B.
- Suero de ternera fetal sin exosomas.

Para la realización de los experimentos fue necesario que las BSMC (Lonza) se encontraran en el tercer pase de crecimiento. Por ello las células se cultivaron siguiendo el mismo procedimiento detallado para las SAEC en el apartado 3.4.2. Sin embargo, en este caso la concentración celular inicial fue de 3.500 células/cm².

3.5. PURIFICACIÓN DE EXOSOMAS PROCEDENTES DE EOSINÓFILOS

Los exosomas producidos por 4 x 10⁶ eosinófilos procedentes de individuos sanos o de pacientes asmáticos se aislaron del sobrenadante del medio de cultivo. Para ello, las células se cultivaron durante 24 h en placas de 24 pocillos (Corning®), según las condiciones descritas en el apartado 3.4.1. Tras la incubación se recogieron las células y el medio de cultivo (sobrenadante), mediante el siguiente protocolo:

- A. Sobrenadante.** En él se encuentran los exosomas secretados por los eosinófilos. Para purificarlos, primero el medio de cultivo se sometió a una serie de centrifugaciones en pasos secuenciales para eliminar cualquier célula y/o resto celular (dos veces a 750 g durante 4 min; una vez a 2000 g durante 4 min; dos veces a 13500 g durante 1 min). Posteriormente, el sobrenadante se ultracentrifugó a 100.000 g durante 16 h a 4°C. El precipitado de exosomas

resultante de la ultracentrifugación se lavó con PBS 1X filtrado y los exosomas se resuspendieron en 60 µL de PBS 1X/EDTA 5 mM. Tras esto, se disgregaron usando una jeringuilla con aguja (1 mL calibre-29 x 1/2", BD Biosciences) y se almacenaron a -80°C para su posterior utilización en los diferentes ensayos. En algunas muestras, estos exosomas se resuspendieron en 700 µL de QIAzol (Qiagen) para la posterior extracción de miARN.

B. Células. Los eosinófilos se separaron del medio de cultivo tras la primera centrifugación a 750 g durante 4 min (mencionada en el punto anterior) y se lavaron con 1 mL de PBS 1X filtrado para eliminar cualquier resto de medio de cultivo que pudiera haber quedado. Tras la centrifugación a 12.000 g durante 1 min, el sobrenadante se descartó y los eosinófilos se resuspendieron en 700 µL de QIAzol (Qiagen) y se guardaron a -80°C, para su posterior utilización en el análisis de miARN.

Previo a la realización de los ensayos funcionales, tanto con eosinófilos como con células epiteliales y musculares, se realizaron curvas dosis-respuesta con diferentes concentraciones de exosomas procedentes de pacientes asmáticos (3, 6 y 12 x 10⁶ exosomas/mL), determinando que la dosis efectiva de exosomas era de 6 x 10⁶ exosomas/mL para todos los tipos celulares. De la misma manera, en algunos experimentos, se utilizaron 6 x 10⁶ exosomas/mL de individuos sanos para definir el efecto que ejercían sobre las células.

3.6. CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS DE EOSINÓFILOS

3.6.1. Identificación de cuerpos multivesiculares y exosomas de eosinófilos

3.6.1.1. Microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal de cuerpos multivesiculares

Los eosinófilos purificados de sujetos asmáticos se mantuvieron en cultivo durante 24 h en las condiciones descritas en el apartado 3.4.1, tras lo cual se lavaron con PBS 1X. Posteriormente, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min a temperatura ambiente y, seguidamente, se pre-incubaron con albúmina de suero bovino (BSA) al 5%, marcándose intracelularmente con los anticuerpos primarios anti-tetraspanina CD63, como anticuerpo específico de vesículas endosomales, y anti-LBPA, como marcador específico de cuerpos multivesiculares (MVB).

Anticuerpo Primario	Dilución	Temperatura /Tiempo	Casa Comercial	Anticuerpo Secundario	Dilución	Temperatura /Tiempo	Casa Comercial
Anti-CD63 de humano hecho en ratón	1:200	4°C/1 h	Immunostep S.L., (Salamanca, España)	Anti-IgG de ratón hecho en cabra-FITC	1:500	4°C/1 h	BD Biosciences
Anti-LBPA de humano hecho en ratón	1:200	4°C/1 h	Echelon Biosciences (Salt Lake City, UT, Estados Unidos)	Anti-IgG de ratón hecho en cabra-Alexa Fluor 647	1:500	4°C/1 h	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific

Tabla 1. Condiciones experimentales del inmunomarcaje para la identificación de MVB de eosinófilos mediante microscopía confocal y de epifluorescencia. FITC, isotiocianato de fluoresceína; IgG, inmunoglobulina G; LBPA, ácido lisobisfosfatídico.

Las condiciones experimentales que se utilizaron en la incubación de los anticuerpos (todos ellos diluidos en PBS 1X/BSA 0,5%/Tritón X-100 0,1%) se detallan en la Tabla 1. Finalmente, para visualizar los núcleos de las células se añadió 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 300 nM (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific). Como control negativo se utilizaron células en presencia de anticuerpo secundario.

La microscopía confocal se realizó en un microscopio Leica acoplado a un escáner Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y un objetivo 63 NA 1.4 Plan Apo. Las imágenes de las células se consiguieron con una sección óptica de 0,7 μ m. Para analizar las imágenes se utilizó el *software ImageJ* (National Institutes of Health, Rockville, MD, Estados Unidos).

Las imágenes de microscopía de epifluorescencia se tomaron en un microscopio Nikon Eclipse TE2000S (Nikon Instruments, Melville, NY, Estados Unidos) equipado con una cámara digital DS-Qi1Mc y un objetivo Plan Apo VC 60 1.4. Las imágenes digitales obtenidas se analizaron mediante el *software* NIS-AR (Nikon Instruments). Todas las imágenes fueron tomadas en el eje z correspondiente a la máxima intensidad de fluorescencia observada. Se analizaron un mínimo de 50 células por cada condición del ensayo, correspondientes a diferentes campos del microscopio.

3.6.1.2. Microscopía electrónica de transmisión de cuerpos multivesiculares y exosomas

Los eosinófilos en cultivo se recogieron y se fijaron en una solución de fijación compuesta por: paraformaldehído 1%, glutaraldehído 1,5% y CaCl₂ 0,025% en un tampón de cacodilato de sodio 0,1 M, pH 7,4, durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se resuspendieron en un tampón de cacodilato de sodio 0,1 M frío (pH 7,4) y se procedió al marcaje con el anticuerpo primario anti-LBPA.

Por otra parte, los exosomas procedentes de los eosinófilos se resuspendieron en PBS 1X/EDTA 5 mM y se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 1 h a temperatura ambiente, antes de proceder al marcaje con anti-CD63 y anti-ALIX. Previo a la realización de la microscopía electrónica, estas muestras se trataron con glutaraldehído al 2,5% y se contrastaron añadiendo acetato de uranilo al 2%.

Anticuerpo Primario	Dilución	Temperatura /Tiempo	Casa Comercial	Anticuerpo Secundario	Dilución	Temperatura /Tiempo	Casa Comercial
Anti-LBPA de humano hecho en ratón	1:50	TA/2 h	Echelon Biosciences	Anti-IgG de ratón hecho en cabra-Oro 5 nm	1:20	TA/1 h	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
Anti-CD63 de humano hecho en ratón	1:20	TA/2 h	Immunostep S.L.	Anti-IgG de ratón hecho en cabra-Oro 5 nm	1:20	TA/1 h	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
Anti-ALIX de humano hecho en ratón	1:20	TA/2 h	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, Estados Unidos)	Anti-IgG de ratón hecho en cabra-Oro 5 nm	1:20	TA/1 h	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)

Tabla 2. Condiciones experimentales del inmunomarcaje para la caracterización de moléculas específicas de exosomas y de su biogénesis mediante microscopía electrónica de transmisión. IgG, inmunoglobulina G; LBPA, ácido lisobisfosfatídico; TA, temperatura ambiente.

Tanto los anticuerpos primarios como los anticuerpos secundarios conjugados con las nanopartículas de oro de 5 nm se diluyeron en PBS 1X/BSA 0,1%. Las condiciones experimentales seguidas durante el inmunomarcaje se detallan en la Tabla 2.

Las preparaciones se examinaron con un microscopio de transmisión electrónica JEOL JEM1010 (JEOL USA, Peabody, MA, Estados Unidos) de 80 kV para células y 100 kV para exosomas, en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Unidad de Microscopía de la Universidad Autónoma de Madrid.

3.6.2. Movilización y secreción de exosomas

3.6.2.1. Inducción e inhibición de la secreción de exosomas

Para inducir la secreción de exosomas se incubaron 2×10^6 eosinófilos de pacientes asmáticos con IFN- γ (20 ng/mL; R&D Systems, Bio-Techne) durante 10 min, 4 h o 16 h, dependiendo del tipo de ensayo, o con CCL11/eotaxina-1 (100 ng/mL; R&D Systems, Bio-Techne) durante 1 h. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂.

Para estudiar si la liberación de los exosomas es un proceso regulado o solamente inducido, se realizaron ensayos de inhibición de su secreción añadiendo al cultivo de eosinófilos un inhibidor específico de la proteína quinasa C (PKC): Gö6985 (Sigma Aldrich, Merck KGaA) a una concentración final de 5 μ M durante 20 min a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂, de forma previa al tratamiento con IFN- γ .

3.6.2.2. Movilización de los gránulos del eosinófilo

3.6.2.2.1. Ensayos de transfección y expresión del vector

Para realizar la transfección, 2×10^6 eosinófilos purificados de pacientes asmáticos se incubaron con 20 μ g del plásmido pEFGFP-C1bosCD63, en un volumen total de 650 μ L, y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ durante 24 h. La eficiencia de transfección rutinaria determinada mediante citometría de flujo fue alrededor del 75%, no siendo necesario ningún método adicional de transfección.

3.6.2.2.2. Microscopía de epifluorescencia

Los eosinófilos transfectados fueron adheridos a placas de cultivo con fondo de cristal de 35 mm (MatTek Corporation, Ashland, MA, Estados Unidos) tapizadas con fibronectina. Estas placas se pusieron en el incubador acoplado al microscopio Nikon Eclipse TE2000S (Nikon Instruments) y los eosinófilos (2×10^6) fueron estimulados con 20 ng/mL de IFN- γ (R&D Systems, Bio-Techne) durante 10 min, 4 h o 16 h, manteniendo las condiciones óptimas de temperatura, humedad y CO₂ mediante un sistema automático *OKO Lab System* (Okolab SRL, Nápoles, Italia).

El ensayo de *time-lapse* se realizó en células vivas y las imágenes de epifluorescencia se analizaron usando el *software* informático NIS-AR (Nikon Instruments). Las imágenes se tomaron cada minuto usando un filtro específico para la proteína verde fluorescente (GFP). Las imágenes de epifluorescencia fueron mejoradas usando el *software* de deconvolución Huygens (*Scientific Volume Imaging B.V.*, Hilversum, Holanda).

3.6.2.2.3. Citometría de flujo

Los eosinófilos procedentes de cultivo con o sin IFN- γ (20 ng/mL; R&D Systems, Bio-Techne) durante 10 min, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min a temperatura ambiente, se pre-incubaron con BSA al 5% y se marcaron intracelularmente con los anticuerpos detallados en la Tabla 3, diluidos en PBS 1X/BSA 0,5%/Tritón X-100 0,1%.

Anticuerpo Primario	Dilución	Temperatura /Tiempo	Casa Comercial	Anticuerpo Secundario	Dilución	Temperatura /Tiempo	Casa Comercial
Anti-CD63 de humano hecho en ratón	1:100	4°C/1 h	Immunostep S.L.	Anti-IgG de ratón hecho en cabra-FITC	1:500	4°C/1 h	BD Biosciences
Anti-LBPA de humano hecho en ratón	1:100	4°C/1 h	Echelon Biosciences	Anti-IgG de ratón hecho en cabra-PE	1:500	4°C/1h	BD Biosciences

Tabla 3. Condiciones experimentales del inmunomarcaje de proteínas de MVB de eosinófilos identificadas mediante citometría de flujo. FITC, isotiocianato de fluoresceína; IgG, inmunoglobulina G; LBPA, ácido lisobisfosfatídico; PE, ficoeritrina.

Después del marcaje intracelular de 1×10^5 eosinófilos, se analizó la intensidad media de fluorescencia (IMF) del LBPA y de CD63 utilizando un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Biosciences). En cada ensayo se evaluaron entre 50.000 y 100.000 células.

3.6.3. Caracterización morfológica y proteica de los exosomas

3.6.3.1. Análisis de seguimiento de nanopartículas

La distribución de tamaño y la cuantificación de la concentración de las muestras de los exosomas se analizaron mediante la tasa de movimiento browniano usando un sistema *NanoSight LM10* (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido), el cual está equipado con un vídeo de captura, así como con un *software* de seguimiento de partículas [138,139].

Los exosomas obtenidos del sobrenadante del cultivo de 4×10^6 eosinófilos procedentes de eosinófilos de sujetos sanos y de pacientes asmáticos, como se ha especificado en el apartado 3.5., se inyectaron en la cámara del *NanoSight LM10* en un volumen final de 0,5 mL de PBS 1X/EDTA 5 mM. El tamaño (nm) y concentración (partículas/mL) de los exosomas se obtuvo por la determinación de la media \pm desviación estándar (DE) de tres medidas independientes realizadas en cada una de las muestras.

3.6.3.2. Espectrometría de masas

La caracterización de las proteínas de los exosomas se realizó en dos grupos de muestras procedentes de las dos poblaciones de estudio, las cuales estaban compuestas por exosomas procedentes de 7 individuos sanos y de 8 pacientes asmáticos, minimizándose de esta forma la posible variación entre muestras.

El análisis de las proteínas se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, mediante cromatografía inversa en fase líquida RP-LC-MS/MS, en un sistema Easy-nLC II acoplado a un espectrómetro híbrido de masas LTQ-Orbitrap-Velos-Pro (Thermo Fisher Scientific), siguiendo el protocolo descrito en estudios anteriores [140,141].

Brevemente, las muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), en un gel separador al 10% y un gel concentrador al 5%, y en condiciones reductoras. Seguidamente, las proteínas fueron reducidas, alquiladas y digeridas *in situ* con un gradiente de tripsina (Promega, Madison, WI, Estados Unidos). Posteriormente, se secaron y desalaron, siendo digeridas y resuspendidas en 10 μ L de ácido fórmico 0,1% para su análisis en el espectrómetro de masas.

La identificación de los datos crudos se llevó a cabo usando el algoritmo SEQUEST (*Proteome Discovered 1.4*, Thermo Fisher Scientific). La búsqueda se hizo comparando las secuencias obtenidas con la base de datos de *UniProtKB* (<http://www.uniprot.org>) correspondiente a humano.

Para que las proteínas identificadas fueran incluidas en el estudio tenían que tener secuencias de, al menos, 2 péptidos únicos.

3.7. ENSAYOS FUNCIONALES EN EOSINÓFILOS Y EN CÉLULAS ESTRUCTURALES DE PULMÓN

3.7.1. Apoptosis

3.7.1.1. Ensayos de anexina V

Se cultivaron 5×10^5 eosinófilos procedentes de pacientes asmáticos por pocillo en placas de 24 pocillos (Corning®), según las condiciones descritas en el apartado 3.4.1., a los cuales se añadieron 3, 6 y 12×10^6 exosomas/mL de pacientes asmáticos o 6×10^6 exosomas/mL de individuos sanos y se dejaron 24 h en presencia de estos.

Las células epiteliales de vías respiratorias pequeñas (SAEC) se cultivaron en tercer pase en placas de 24 pocillos (Corning®). En cada uno de ellos se pusieron 40.000 células, dejándolas crecer el tiempo necesario hasta alcanzar un 80-90% de confluencia. Cuando las células estuvieron listas para la realización de los ensayos, se añadieron 500 μ L de medio con 6×10^6 exosomas/mL de eosinófilos de pacientes asmáticos o de individuos sanos durante 6 h, 24 h y 48 h. Transcurrido el tiempo de

incubación, las células se recogieron de los pocillos con tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich, Merck KGaA), se contaron al microscopio, previa tinción con azul tripán (Sigma-Aldrich, Merck KGaA), para determinar la viabilidad y se lavaron con 1 mL de PBS 1X.

Tras el cultivo correspondiente, se determinó la apoptosis de las células mediante citometría de flujo (FACSCanto II, BD Biosciences), usando el *AnnexinV-FITC Apoptosis Detection kit* (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. De forma resumida, 1×10^5 células se marcaron con un anticuerpo contra la molécula anexina V conjugado con FITC (dilución 1:40). Posteriormente, se añadió yoduro de propidio (PI) a una concentración final de $1 \mu\text{g/mL}$, para determinar la desintegración del ADN.

De esta manera, se distinguen 4 fases (Fig. 13):

1. Vivas: marcaje doble negativo.
2. Apoptosis temprana: marcaje simple positivo para la anexina V. Este estado es reversible.
3. Apoptosis tardía: doble marcaje positivo para la anexina V y el PI. Es un estatus irreversible.
4. Necrosis: marcaje simple positivo para el PI.

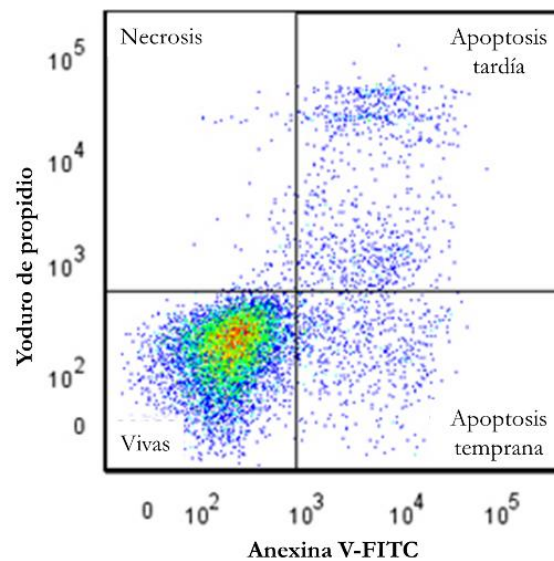


Figura 13. Esquema representativo de una gráfica de puntos obtenida por citometría de flujo de los ensayos de apoptosis. La imagen representa las cuatro fases en las que se pueden encontrar las células: vivas, en apoptosis temprana, en apoptosis tardía o en necrosis.

Se contabilizaron 10.000 eventos por cada ensayo. Las células anexina V-FITC⁺/PI-PerCP-Cy5⁻ y anexina V-FITC⁺/PI-PerCP-Cy5⁺ se seleccionaron para definir el porcentaje total de apoptosis.

3.7.1.2. Ensayos de TUNEL

Para confirmar los resultados obtenidos en los ensayos de apoptosis por citometría de flujo en las SAEC se utilizó la técnica de TUNEL, que emplea como base la técnica de la inmunofluorescencia y su posterior visualización por microscopía confocal.

Inicialmente, se cultivaron 80.000 SAEC por pocillo en tercer pase en una platina de imagen celular

Materiales y Métodos

de dos pocillos (*Cell Imaging Slide*, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Las células se dejaron crecer hasta alcanzar el 80-90% de confluencia, tras lo cual se retiró el medio de cultivo y se lavaron con PBS 1X estéril, para eliminar cualquier resto de medio y posibles células muertas. A continuación, se añadieron 2 mL de medio de cultivo por pocillo, el cual contenía 6×10^6 exosomas/mL procedentes de eosinófilos de pacientes asmáticos o de individuos sanos y se dejaron incubando durante 24 h a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Como control negativo se utilizó medio ultracentrifugado sin exosomas.

El control positivo se realizó mediante un tratamiento de las SAEC con DNasa I, en el cual las células se pre-trataron con tampón DN (Trizma base 30 mM pH 7,2, MgCl₂ 4 mM, DTT 0,1 mM) durante 5 min a temperatura ambiente y, seguidamente, se añadió DNasa I (Qiagen) disuelta en tampón DN a una concentración final de 1,0 µg/mL (lo cual equivale a una actividad específica de 10.000 U/mL), permitiendo que se produjera la reacción durante 10 min a temperatura ambiente. Para eliminar la DNasa I, las células se lavaron 5 veces con H₂O bidestilada, dejando 3 min entre cada lavado.

Una vez las células estaban preparadas para el ensayo, se utilizó el kit *ApopTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Detection* (Merck Millipore, Merck KGaA) para la determinación de la apoptosis, siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el objetivo de teñir los núcleos, se añadió DAPI 300 nM (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) y las células se incubaron durante 30 min a 37°C en oscuridad.

Las células se visualizaron inmediatamente en un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems), donde se tomaron imágenes con el objetivo de 20X de diferentes campos. Los resultados se expresan como la media del porcentaje de células apoptóticas/células DAPI⁺ contadas en 11-25 campos diferentes.

3.7.2. Estudio de la adhesión celular y la migración en eosinófilos

3.7.2.1. Adhesión

Los experimentos de adhesión, realizados en placa de 96 pocillos (Corning®), se iniciaron añadiendo 60 µL a cada pocillo de una solución de fibronectina diluida en PBS 1X (20 µg/mL; R&D Systems, Bio-Techne), y se incubó toda la noche a 4°C. A continuación, se bloquearon los sitios libres de unión con BSA 0,1% diluida en PBS 1X, para evitar las uniones inespecíficas. Los eosinófilos purificados de sangre periférica de individuos asmáticos, y procedentes de cultivo durante 24 h con IL-5 y GM-CSF, se añadieron a la placa (70.000 células por pocillo) junto con exosomas de pacientes asmáticos (3, 6 y 12×10^6 exosomas/mL), 6×10^6 exosomas/mL de individuos sanos o solo el medio ultracentrifugado (control), incubando la placa durante 90 min a 37°C con 5% CO₂. Tras realizar dos lavados con PBS 1X para eliminar los eosinófilos que no se habían adherido, se midió la actividad residual de la peroxidasa del eosinófilo en las células que habían quedado pegadas a la placa, añadiendo 100 µL del sustrato de la peroxidasa por pocillo: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) de

BD OptEIA (BD Biosciences). Para detener la reacción se añadieron 50 μ L de H_2SO_4 1 M en cada pocillo. La actividad residual de la peroxidasa se cuantificó por un método colorimétrico, midiendo la densidad óptica (D.O.) a 450 nm en un lector de placas *Infinite® M200* (Tecan, Männedorf, Suiza).

La adhesión fue calculada como el incremento de la D.O. a 450 nm en los eosinófilos cultivados en presencia de exosomas frente al control negativo. Todas las medidas se hicieron por triplicado.

3.7.2.2. Migración (Quimiotaxis y Quimiocinesis)

Para efectuar estos ensayos se utilizaron eosinófilos purificados de pacientes con asma procedentes de cultivo durante 24 h según las condiciones descritas en el apartado 3.4.1., pero sin la presencia de IL-5 ni de GM-CSF.

En la realización de los ensayos de quimiotaxis, se añadieron 3, 6 y 12 x 10⁶ exosomas/mL de eosinófilos de pacientes asmáticos, CCL11/eotaxina-1 (25, 50 y 100 ng/mL; R&D Systems, Bio-Techne) o ambos estímulos juntos al medio de cultivo que estaba en la parte inferior de los pocillos. Como control se añadió medio ultracentrifugado. También se realizaron estos ensayos con exosomas de individuos sanos (6 x 10⁶ exosomas/mL). A continuación, se llevaron a cabo los ensayos de migración, que se detallan más adelante en este mismo apartado. La eotaxina-1 se utilizó como quimioatrayente selectivo de eosinófilos [142].

Para desarrollar los ensayos de quimiocinesis, los eosinófilos procedentes de cultivo se estimularon con exosomas de pacientes asmáticos (6 x 10⁶ exosomas/mL) o IL-5 (5 ng/mL) más GM-CSF (10 ng/mL) durante 90 min a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. A continuación, los eosinófilos estimulados de esta manera se utilizaron para realizar los ensayos de migración. En este caso no se añadió ningún estímulo en el medio de cultivo de la parte inferior de los pocillos. La IL-5 y el GM-CSF se usaron como estímulos quimiocinéticos de eosinófilos [142].

Los ensayos de migración se realizaron en placas de 24 pocillos (Corning®), utilizando filtros de cultivo celular con un poro de 5 μ m de diámetro (Merck Millipore, Merck KGaA). En la parte superior del filtro se añadieron 2,5 x 10⁵ eosinófilos procedentes de las condiciones de cultivo previamente mencionadas (ensayos de quimiotaxis o quimiocinesis). En la parte inferior, los pocillos se llenaron con 600 μ L de medio RPMI-1640 completo sin rojo fenol. La migración se llevó a cabo mediante la incubación de las células a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 90 min. Finalizado el tiempo de incubación se determinó el número de eosinófilos migrados, cuantificando el número de eventos durante 3 min en el citómetro de flujo (FACSCanto II, BD Biosciences). Los resultados se expresan como el aumento o la disminución de la migración de los eosinófilos en las diferentes condiciones ensayadas respecto al control (medio ultracentrifugado sin exosomas).

3.7.2.3. Moléculas de adhesión y receptor implicado en la migración

Los eosinófilos de individuos asmáticos procedentes de algunos de los ensayos de migración

(quimiotaxis), se recogieron y se utilizaron para realizar el marcaje de las moléculas de adhesión más comunes e importantes en este tipo celular con los siguientes anticuerpos de humano: anti-CD54-PE (ICAM-1), anti-CD106-FITC (VCAM-1), anti-CD49d-PE (VLA-4) y anti-CD49b-FITC (integrina α_2), todos ellos adquiridos a la casa comercial BD Biosciences. También se procedió al marcaje de uno de los receptores implicados en la migración: el receptor de quimiocina 3 conjugado con FITC (CCR3-FITC) (R&D Systems, Bio-Techne). Previo al marcaje, se bloquearon los receptores de la fracción constante de inmunoglobulinas (Fc), incubando los eosinófilos con un reactivo comercial (FcR *Blocking Reagent*, MACS, Miltenyi Biotec) durante 10 min en hielo. Como control de isotipo se utilizó el marcaje IgG1-FITC/IgG2a-PE (BioLegend, San Diego, CA, Estados Unidos). Todos los anticuerpos se utilizaron en una dilución de 1:200 en PBS 1X/STFi 2%/EDTA 1 mM.

El porcentaje de expresión de las moléculas de adhesión y del receptor CCR3 tras la migración de los eosinófilos hacia los exosomas de pacientes asmáticos o hacia el medio ultracentrifugado (control) se analizó por citometría de flujo, evaluando 10.000 células por ensayo y determinando el porcentaje de células con fluorescencia positiva para cada una de las moléculas de estudio.

3.7.3. Determinación de la producción de óxido nítrico

Para la realización de estos ensayos se utilizaron 5×10^5 eosinófilos procedentes de pacientes asmáticos por pocillo, los cuales se cultivaron en placas de 24 pocillos (Corning®) durante 24 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% en ausencia de IL-5 y GM-CSF. A estas células se añadieron diferentes dosis de exosomas de eosinófilos de origen asmático (3 , 6 y 12×10^6 exosomas/mL) o exosomas de eosinófilos de individuos sanos (6×10^6 exosomas/mL). Como control negativo se utilizó medio ultracentrifugado. La concentración total de nitritos se determinó en el sobrenadante de dichos cultivos mediante el kit colorimétrico *Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite Assay* (R&D Systems, Bio-Techne), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Dicha concentración se determinó mediante la lectura de la D.O. a 540 nm realizada en un lector de placas *Infinite® M200* (Tecan). El resultado se expresa como la concentración de nitritos en $\mu\text{mol/L}$. Para evitar sobrestimar la concentración de nitritos, se cuantificaron los niveles de nitritos endógenos y se restaron a los niveles obtenidos de nitritos totales.

3.7.4. Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para detectar y cuantificar las ROS, se cultivaron 5×10^5 eosinófilos de pacientes asmáticos por pocillo en placas de 24 pocillos (Corning®) durante 24 h en las condiciones descritas en el apartado 3.4.1. Seguidamente, se añadieron exosomas de pacientes asmáticos (3 , 6 y 12×10^6 exosomas/mL), exosomas de sujetos sanos (6×10^6 exosomas/mL) o medio ultracentrifugado (control), incubándose durante 2 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, tras lo cual se añadió la sonda fluorescente intracelular que detecta las ROS: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA, Thermo Fisher Scientific) en una concentración final de $5 \mu\text{M}$. Tras esto, las células se incubaron durante 30

min a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, evaluándose la producción de ROS mediante citometría de flujo con un citómetro FACSCanto II (BD Biosciences). En cada ensayo se analizaron 20.000 células.

Los resultados se expresan como la variación de la IMF de los eosinófilos cultivados con exosomas de sujetos sanos o de pacientes asmáticos en relación al control.

3.7.5. Reparación del daño epitelial establecido (ensayos de cierre de herida)

Para realizar este ensayo, se cultivaron 80.000 SAEC por pocillo en tercer pase en una platina de imagen celular de dos pocillos (*Cell Imaging Slide*, Eppendorf). Las células se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 95-100%, tras lo cual se realizó una herida artificial ejerciendo presión con una punta de pipeta de 200 µL. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X estéril para retirar cualquier resto celular, y se añadieron 2 mL de medio de cultivo por pocillo, adicionando 6 x 10⁶ exosomas/mL procedentes de eosinófilos de pacientes asmáticos a uno de los pocillos (el otro se utilizó como control, donde se añadió medio ultracentrifugado sin exosomas). También se realizaron estos ensayos en células cultivadas con 6 x 10⁶ exosomas/mL procedentes de individuos sanos.

Los ensayos de cierre de herida se llevaron a cabo en un microscopio Nikon Eclipse TiE 2000S (Nikon Instruments) equipado con una cámara digital DS-Qi1Mc y un objetivo 10X Plan Apo VC 60 NA 1.4 y las condiciones de cultivo fueron controladas usando un incubador automático OKO *Lab System* (Okolab SRL). Para visualizar la evolución de la reparación de dicha herida, se tomaron fotografías de diferentes zonas de la herida a diferentes tiempos: las 4 primeras horas del ensayo se tomaron cada 10 min, y las horas siguientes hasta el cierre completo de herida cada 20 min, con 1 seg de tiempo de exposición.

El análisis y procesamiento de las imágenes se realizó por diferentes programas informáticos: NIS-AR (Nikon Instruments) y el programa de dominio público *ImageJ* (*National Institutes of Health*). Con este último *software* se determinó la disminución del área de la herida a medida que transcurría el tiempo.

Los resultados se expresan como el cierre de herida relativo, definido como el porcentaje de área cubierta por las células en relación a la reparación completa de la herida en el control a las 24 h.

3.7.6. Hiperplasia de células del músculo liso bronquial (BSMC)

3.7.6.1. Proliferación

Para evaluar la proliferación celular se utilizó el Test de Proliferación Celular en Placa *ELISA Biotrake*® (*Amersham Cell Proliferation Biotrake ELISA System*, GE Healthcare), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante del kit. Dicho método se basa en la cuantificación de la incorporación de la 5'-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), durante la síntesis de ADN, por las células en proliferación.

Para desarrollar estos ensayos se cultivaron 5.000 BSMC por pocillo en placas de 96 pocillos

Materiales y Métodos

(Corning®) y se dejaron incubando durante 24 h a 37°C y 5% CO₂. Pasado ese tiempo, se añadieron 100 µL de medio/pocillo con exosomas procedentes de eosinófilos de pacientes asmáticos y de sujetos sanos (6 x 10⁶ exosomas/mL), excepto a las células del control negativo a las que se adicionó medio ultracentrifugado, incubándose durante diferentes tiempos: 24 h, 48 h y 72 h.

Transcurrido ese tiempo se añadió la BrdU y, tras 24 h, se llevó a cabo la medida de la D.O. a 450 nm en el lector de placa *Infinite® M200* (Tecan) para determinar la proliferación. Los valores de D.O. se correlacionan directamente con la cantidad de síntesis de ADN y, en consecuencia, con el cambio en la proliferación de las células en cultivo.

Los resultados están expresados como el aumento o la disminución de la proliferación de las BSMC incubadas con exosomas de individuos sanos o asmáticos en relación al control (células cultivadas con medio ultracentrifugado).

3.7.6.2. Inhibición de la proliferación

Se cultivaron 5.000 BSMC por pocillo, en placas de 96 pocillos (Corning®), con 100 µL de medio durante 24 h a 37°C y 5% CO₂. Pasado este tiempo, se añadió a las células el inhibidor de la fosforilación de ERK1/2: PD98059 (Sigma-Aldrich, Merck KGaA) a una concentración final de 50 µM, durante 2 h, previo a la adición de los exosomas. Se retiró el medio que contenía el inhibidor, las células se lavaron con PBS 1X estéril y se añadió medio de cultivo el cual contenía 6 x 10⁶ exosomas/mL de origen asmático. Por último, las células se incubaron durante 72 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, realizando a continuación el ensayo de proliferación, como está detallado en el apartado anterior.

3.7.7. Mecanismo de actuación de los exosomas

3.7.7.1. Microscopía confocal de eosinófilos

Para determinar cómo ejercen sus efectos los exosomas sobre los eosinófilos, se analizó si dichos exosomas actúan por simple contacto con la superficie celular o, por el contrario, son internalizados por la célula.

Para la realización de estos ensayos, se marcaron exosomas purificados de pacientes asmáticos con el anticuerpo de humano anti-CD63 (Calbiochem, Merck KGaA; dilución 1:30) durante toda la noche a 4°C. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor-647 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific; dilución 1:40), y se incubó durante 2 h en hielo y oscuridad. Para descartar posibles uniones inespecíficas, se realizaron diferentes controles que se detallan más adelante en este apartado. Después del marcaje, se añadieron 6 x 10⁶ exosomas marcados/mL procedentes de individuos asmáticos a un cultivo de 2 x 10⁵ eosinófilos de pacientes asmáticos, a los que se les había teñido el núcleo con DAPI 300 nM (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific).

La placa de cultivo en la que se realizó el ensayo (*Imaging Dish*, Miltenyi Biotec) se colocó inmediatamente en un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems), donde se obtuvieron imágenes con el objetivo de 20X y aplicando un aumento de 5X. Durante todo el ensayo se mantuvieron las condiciones de temperatura, humedad y CO₂ óptimas (37°C, 5% CO₂).

Los controles realizados en estos ensayos fueron los siguientes:

- Control negativo. Se cultivaron eosinófilos sin añadirles exosomas marcados. La única tinción que se realizó fue la del núcleo mediante DAPI.
- Control anticuerpo secundario Alexa Fluor-647. Se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor-647 (dilución 1:40) para desestimar posibles uniones inespecíficas a los eosinófilos.
- Control anticuerpo CD63 + Alexa Fluor-647. Se añadió al cultivo de eosinófilos una mezcla de los anticuerpos anti-CD63 (dilución 1:30) con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón Alexa Fluor-647 (dilución 1:40). De esta manera, se descartan las posibles uniones no deseadas de estos anticuerpos, tanto a sitios inespecíficos como a moléculas de CD63 localizadas en el interior celular o en la superficie celular.

3.7.7.2. Microscopía confocal de células estructurales

Para desarrollar estos ensayos se cultivaron SAEC en tercer pase (2.500 células/cm²) en una placa de imagen celular de dos pocillos (*Cell Imaging Slide*, Eppendorf) y BSMC en tercer pase (3.500 células/cm²) en una placa apta para microscopía confocal (*Imaging Dish*, Miltenyi Biotec). Las células se incubaron durante 72 h en las condiciones previamente descritas en los apartados 3.4.2. y 3.4.3., hasta alcanzar una confluencia del 80-90%. De forma previa a la adición de los exosomas marcados, se tiñó el núcleo con DAPI 300 nM (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific).

El marcaje de los exosomas se llevó a cabo con el marcador lipofílico fluorescente PKH67 (Sigma-Aldrich, Merck KGaA), siguiendo las instrucciones del fabricante. De forma resumida, en un volumen de 100 µL de PBS 1X/EDTA 5 mM se añadieron exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos y de individuos sanos para obtener una concentración final de 6 x 10⁶ exosomas/mL. A continuación, los exosomas resuspendidos se mezclaron con 100 µL de la sonda PKH67 (concentración final de 2 µM) diluida en diluyente C y se dejaron incubando durante 5 min a temperatura ambiente, agitándolo con la pipeta cada minuto. Se añadieron 200 µL de una solución de BSA al 5% para detener la reacción. Para eliminar el exceso de sonda no unida, se utilizaron las *Exosome Spin Column* (Thermo Fisher Scientific), añadiendo la muestra de exosomas marcados al polímero de la columna, centrifugando 2 min a 750 g y recogiendo el eluido. Como control negativo, se utilizaron 100 µL de PBS 1X/EDTA 5 mM, siguiendo el mismo procedimiento.

Para observar la captación de exosomas, la placa de cultivo se colocó en un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems), donde se obtuvieron imágenes con el objetivo de 20X y

aplicando un aumento de 5X. En todo momento se mantuvieron las condiciones de temperatura, humedad y CO₂ óptimas (37°C, 5% CO₂).

3.8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS Y MEDIADORES PRO-INFLAMATORIOS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

3.8.1. Obtención de las muestras

Se cultivaron 2.500 SAEC/cm² y 3.500 BSMC/cm² en placas de 12 pocillos (Corning®), añadiendo 500 µL de medio/pocillo, las cuales se dejaron crecer hasta alcanzar un 80-90% de confluencia. En ese momento, se retiró el medio de cultivo, se lavaron con PBS 1X y se añadió 1 mL de medio por pocillo con 6×10^6 exosomas de pacientes asmáticos o de individuos sanos, o medio ultracentrifugado sin exosomas en el caso del control. Se dejaron incubando a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ durante 3 h, 6 h y 24 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron con PBS 1X y se recogieron del pocillo con tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich, Merck KGaA). A continuación, se volvieron a lavar con PBS 1X, se añadió 1 mL de QIAzol (Qiagen) y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

3.8.2. Extracción del ARN

La extracción del ARN se hizo mediante el método de Chomczynski [143]. La cantidad de ARN obtenida se cuantificó en un espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (Bonsai Advanced Technologies, Madrid, España). La contaminación de las muestras, con impurezas orgánicas e inorgánicas, afecta de manera significativa a la sensibilidad y especificidad del resultado, por lo que también se comprobó la pureza de la muestra, determinada por las siguientes relaciones de absorbancias (A): A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , las cuales han de tener unos valores comprendidos entre 1,8 y 2.

3.8.3. Síntesis del ADN complementario

Se retrotranscribió 1 µg de ARN a ADN complementario (ADNc) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas en el kit de transcripción inversa *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific).

La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 20 µL de un tampón adecuado, el cual contenía la enzima transcriptasa inversa *MultiScript*, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) y cebadores aleatorios. El ARN disuelto en agua libre de ARNasas se añadió a la mezcla de reacción.

La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador 2720 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), con el siguiente programa de temperaturas y tiempos: 10 min a 25°C, 120 min a 37°C y 5 min a 85°C. Finalizada la reacción, las muestras se guardaron a -20°C hasta su utilización.

3.8.4. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) se realizó en el sistema de PCR a tiempo real 7500 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). La mezcla de reacción (*TaqMan Universal PCR Master Mix*) y las sondas *TaqMan* se compraron a la casa comercial Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific). Las sondas *TaqMan* utilizadas, específicas de humanos, fueron las correspondientes a los siguientes genes: *GAPDH*, *TNF*, *CCL26*, *POSTN*, *TSLP*, *NFKB2*, *TLR3*, *IL33*, *EGF*, *FLG*, *CCR3*, *VEGFA*, *TGFB1*, *MMP9* y *FGF2*. Todas estas sondas poseen una eficiencia igual a 2. En cada reacción se utilizaron 100 ng de ADNc.

El programa de PCR constó de 40 ciclos de amplificación (15 seg a 95°C y 1 min a 60°C).

La expresión del ARN se analizó en cada muestra utilizando el valor del ciclo umbral (Ct) obtenido con cada gen de interés. Cada muestra se realizó por triplicado y se calculó la media de los Ct de cada gen, siempre que no difirieran entre ellos más de 0,5 ciclos. Dicho Ct fue relativizado al Ct del gen endógeno (*GAPDH*). Finalmente, la expresión génica relativa se calculó de la siguiente manera [144]:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}; \text{ donde } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Exosomas}} - \Delta Ct_{\text{Control}}; \text{ donde } \Delta Ct = \bar{X} Ct_{\text{gen}} - \bar{X} Ct_{\text{GAPDH}}$$

3.9. MEDIDA DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas, tanto intracelulares como liberadas por las células, se evaluaron mediante dos técnicas diferentes: *western blot* y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

3.9.1. Identificación y cuantificación de proteínas mediante *western blot*

3.9.1.1. Obtención de extractos proteicos

Se cultivaron 2×10^6 eosinófilos procedentes de pacientes asmáticos o de individuos sanos en placas de 24 pocillos (Corning®) a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂, en las condiciones de cultivo descritas en los apartados 3.4.1 y 3.6.2.1. Finalizado el correspondiente tiempo de incubación, se recogieron los eosinófilos y se aislaron los exosomas que habían liberado al sobrenadante, de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 3.5.

Por otro lado, se cultivaron 2.500 SAEC/cm² y 3.500 BSMC/cm² en placas de 6 pocillos (Corning®) a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ hasta que alcanzaron un 80-90% de confluencia. En ese momento, se añadieron 2 mL de medio con 6×10^6 exosomas/mL procedentes de pacientes asmáticos o de individuos sanos, o medio ultracentrifugado (control) y se incubaron a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ durante 24 h y 48 h (SAEC) o 72 h (BSMC). Las células del músculo liso bronquial también se incubaron con el inhibidor PD98059 previo a la adición de exosomas de origen asmático, en las condiciones detalladas en el apartado 3.7.6.2.

Materiales y Métodos

Cuando finalizó el tiempo de incubación de cada uno de los ensayos, los eosinófilos, los exosomas purificados y las células estructurales (SAEC y BSMC) se recogieron en tampón de lisis de proteínas, en una relación de 50 μ L por cada 1×10^6 células, constituido por: Tris-HCl 20 mM, NaP_2O_7 30 mM, NaCl 40 mM, EDTA 5 mM pH 7,4, NP-40 1%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, Na_3VO_4 2 mM, ácido desoxicólico 0,5%, leupeptina 10 μ g/mL y aprotinina 5 μ g/mL. Las muestras se dejaron en hielo 15 min, agitándolas cada 2 min, y transcurrido ese tiempo se centrifugaron 5 min a 4°C a 12.000 g, recogiendo el sobrenadante y almacenándolo a -20°C hasta su utilización.

La concentración de proteínas procedentes de las BSMC y las SAEC se determinó por el método colorimétrico de Bradford [145] mediante el uso del reactivo *Bio-Rad protein assay* (Bio-Rad, Hércules, CA, Estados Unidos) y cuantificando las muestras en un *Nanodrop ND-1000* (Bonsai Advanced Technologies). La curva patrón se construyó utilizando diluciones seriadas 1:2 de BSA de concentración conocida (rango de curva: 2.000-31,25 μ g/ml).

3.9.1.2. Inmunodetección de proteínas

La separación electroforética de las proteínas se realizó, en el caso de eosinófilos y exosomas, con todo el lisado proteico obtenido. Sin embargo, en el caso de las células estructurales se utilizaron 10 μ g de proteína. Estos lisados proteicos se mezclaron con el tampón de carga (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20% y β -mercaptoetanol 1X) y se incubaron a 100°C durante 5 min para conseguir su desnaturalización completa, excepto para la inmunodetección de CD63, en donde el extracto proteico se separó en un gel bajo condiciones no reductoras (sin β -mercaptoetanol), como se describe previamente [146]. Los diferentes lisados de proteínas se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes, y se llevó a cabo la electroforesis (SDS-PAGE) durante 90 min a 100 V.

La transferencia se realizó en membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Amersham, GE Healthcare), utilizando el sistema de transferencia semi-seco (*Trans-Blot Turbo Transfer System*, Bio-Rad). A continuación, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con leche 5% disuelta en PBS 1X/Tween-20 0,2% durante 2 h a temperatura ambiente con balanceo. Después de este bloqueo, las membranas se incubaron con diferentes anticuerpos primarios, y tras sucesivos lavados con PBS 1X/Tween-20 0,2% para eliminar el exceso de anticuerpo no unido, se incubaron con sus respectivos anticuerpos secundarios.

En la Tabla 4 se detallan las condiciones experimentales de las diferentes inmunodetecciones. En todos los casos, los anticuerpos se diluyeron en PBS 1X/Tween-20 0,2%/Leche 0,5% y se dejaron incubando con la membrana en balanceo.

La inmunodetección se realizó por quimioluminiscencia mediante el uso del reactivo ECL (Amersham, GE Healthcare Life Sciences), dejándolo 1 min en contacto con la membrana, tras lo cual se retiró el exceso de líquido y se visualizaron las bandas en un sensor de quimioluminiscencia

Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

Anticuerpo Primario	Dilución	Temperatura /Tiempo	Casa Comercial	Anticuerpo Secundario	Dilución	Temperatura /Tiempo	Casa Comercial
Anti-CD63 de humano hecho en ratón	1:200	4°C/ON	Calbiochem, (Merck KGaA)	Anti-IgG de ratón hecho en cabra-HRP	1:1.000	TA/2 h	Merck Millipore, (Merck KGaA)
Anti-CD9 de humano hecho en ratón	1:200	4°C/ON	Immunostep S.L.	Anti-IgG de ratón hecho en cabra-HRP	1:1.000	TA/2 h	Merck Millipore, (Merck KGaA)
Anti-ALIX de humano hecho en ratón	1:500	4°C/ON	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, Estados Unidos)	Anti-IgG de ratón hecho en cabra-HRP	1:1.000	TA/2 h	Merck Millipore, (Merck KGaA)
Anti-EPO de humano hecho en ratón	1:500	4°C/ON	Chemicon International (Merck KGaA)	Anti-IgG de ratón hecho en cabra-HRP	1:1.000	TA/2 h	Merck Millipore, (Merck KGaA)
Anti-MBP de humano hecho en ratón	1:500	4°C/ON	Chemicon International, (Merck KGaA)	Anti-IgG de ratón hecho en cabra-HRP	1:1.000	TA/2 h	Merck Millipore, (Merck KGaA)
Anti-ECP de humano hecho en conejo	1:500	4°C/ON	Santa Cruz Biotechnology	Anti-IgG de conejo hecho en cabra-HRP	1:1.000	TA/2 h	Merck Millipore, (Merck KGaA)
Anti-fosfo ERK1/2 de humano hecho en conejo	1:1.000	4°C/ON	Cell Signaling Technology	Anti-IgG de conejo hecho en cabra-HRP	1:1.000	TA/2 h	Merck Millipore, (Merck KGaA)
Anti-ERK1/2 de humano hecho en conejo	1:5.000	TA/2 h	Cell Signaling Technology	Anti-IgG de conejo hecho en cabra-HRP	1:5.000	TA/2 h	Merck Millipore, (Merck KGaA)
Anti-fosfo AKT de humano hecho en conejo	1:500	4°C/ON	Cell Signaling Technology	Anti-IgG de conejo hecho en cabra-HRP	1:1.000	TA/2 h	Merck Millipore, (Merck KGaA)
Anti-fosfo STAT3 de humano hecho en conejo	1:500	4°C/ON	Cell Signaling Technology	Anti-IgG de conejo hecho en cabra-HRP	1:1.000	TA/2 h	Merck Millipore, (Merck KGaA)
Anti- α -tubulina de humano hecho en ratón	1:1.000	TA/2 h	Santa Cruz Biotechnology	Anti-IgG de ratón hecho en cabra-HRP	1:2.000	TA/2 h	Merck Millipore, (Merck KGaA)
Anti- β -actina de humano hecho en conejo	1:3.000	TA/2 h	Cell Signaling Technology	Anti-IgG de conejo hecho en cabra-HRP	1:5.000	TA/2 h	Merck Millipore, (Merck KGaA)

Tabla 4. Condiciones experimentales de las inmunodetecciones de proteínas de eosinófilos, exosomas y células estructurales mediante *western blot*. HRP, peroxidasa de rábano; ON, toda la noche (*overnight*); TA, temperatura ambiente.

Las bandas obtenidas se densitometraron con el *software* informático *Quantity One* (Bio-Rad). El densitometrado de cada proteína se relativizó frente a α -tubulina, β -actina o ERK1/2, dependiendo del ensayo realizado.

3.9.2. Cuantificación de periostina en plasma

La evaluación de la concentración de periostina en plasma se hizo mediante ELISA utilizando el kit *Human Periostin/OSF-2 DuoSet ELISA* (R&D Systems, Bio-Techne), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. En algunas de las muestras fue necesario diluir el plasma (1:50 o 1:100), debido a que la concentración de proteína sobrepasaba el límite superior de la curva patrón proporcionada por el kit. La curva patrón se construyó utilizando diluciones seriadas 1:2 de periostina de concentración conocida (rango de curva: 4,00-0,0625 ng/ml).

La cuantificación de la concentración de proteína se realizó mediante la lectura de la D.O. a una longitud de onda de 450 nm, con una longitud de onda de corrección de 570 nm, en un lector de placas automático *Infinite® M200* (Tecan).

EVALUACIÓN DE miARN DE EOSINÓFILOS Y DE SUS EXOSOMAS

3.10.1. Secuenciación de nueva generación

La secuenciación masiva o de nueva generación (NGS) de los miARN se realizó en colaboración con la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo (Uruguay).

3.10.1.1. Homogeneización de las muestras

Las muestras de eosinófilos y de exosomas de eosinófilos procedentes de pacientes asmáticos y de individuos sanos que se encontraban almacenadas a -80°C se descongelaron y se homogeneizaron, eliminando con una jeringuilla con aguja (1 mL calibre-29 x 1/2", BD Biosciences) los agregados que pudieran quedar. Después, las muestras se agitaron con el vórtex durante 15 seg para asegurar su correcta disgregación. Una vez homogeneizadas, se dejaron 5 min a temperatura ambiente.

3.10.1.2. Extracción del ARN total enriquecido en miARN

Para extraer la fracción total de ARN, enriquecida en ARN de pequeño tamaño (menores a 200 nucleótidos, miARN), se utilizaron los siguientes kits comerciales siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante: el *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen) para la extracción del ARN de eosinófilos y el *miRNeasy Micro Kit* (Qiagen) para la extracción del ARN de los exosomas de eosinófilos. Estos kits combinan la lisis con fenol/guanidina y una purificación basada en la unión del ARN total a una membrana de sílice.

Tras la extracción, la cantidad de ARN obtenida se cuantificó en un espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (Bonsai Advanced Technologies) comprobando, simultáneamente, la pureza de la muestra según los criterios establecidos en el apartado 3.8.2.

3.10.1.3. Precipitación del ARN

El siguiente paso fue la preparación de las muestras de ARN de eosinófilos de individuos sanos y de pacientes asmáticos para realizar la secuenciación.

En primer lugar, se procedió a la precipitación de los ácidos nucleicos, utilizando el reactivo *GenElute™ LPA* (Sigma-Aldrich, Merck KGaA), el cual es un transportador neutral de poli-acrilamida lineal que ayuda, junto al etanol, a co-precipitar los ácidos nucleicos [147]. Se añadieron al ARN 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2, 0,1 volúmenes del transportador *GenElute™ LPA* (con una concentración inicial de 25 µg/µL) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto (PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemania). Esta mezcla se agitó bien para su correcta homogeneización y se guardó a -80°C. El envío de las muestras se realizó a -80°C.

Cuando la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo (Uruguay) recibió las muestras, estas se centrifugaron durante 5 min a 12.000 g a 4°C, eliminando el sobrenadante con cuidado. El precipitado se lavó con, al menos, 100 µL de etanol al 70% y seguidamente se volvió a centrifugar a 12.000 g durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente para evaporar los restos de etanol. Para finalizar, el precipitado de ácidos nucleicos se disolvió en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM).

3.10.1.4. Secuenciación de nueva generación *Illumina*

Inicialmente se utilizaron 2 µg de ARN total, del cual se prepararon diferentes bibliotecas de ARN mediante el kit *NEBNext® Small RNA Library Prep Set for Illumina®* (New England Biolabs, Ipswich, MA, Estados Unidos), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Después de la purificación y la selección del tamaño, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se realizó el control de calidad de la biblioteca con el *High Sensitivity DNA chip kit for Bioanalyzer* (Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos). Se utilizó el kit *dsDNA broad range* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) para la cuantificación de los ácidos nucleicos en el *QuBit* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). La secuenciación de nueva generación *Illumina* de lectura única se realizó durante 50 ciclos en un secuenciador *Illumina MiSeq* (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos). Posteriormente, se realizaron varios controles de calidad y un análisis de la distribución de tamaño en las secuencias sin procesar. Para eliminar la secuencia del adaptador 5'- AGATCGGAAGAGCACACGTCT desde el extremo 3' de las lecturas, y una longitud de lectura mínima de 17 nucleótidos, se utilizó la herramienta bioinformática *Cutadapt* [148]. Las lecturas finales se alinearon con las secuencias correspondientes al genoma humano de referencia hg38, almacenado en la base de datos *UCSC Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu>, Universidad de California, Santa Cruz, Estados Unidos) usando la herramienta bioinformática *Bowtie* [149]. Para ello se utilizó el modo de alineamiento global y los parámetros *-v2 -a -best -strata*. La anotación de los miARN se realizó de acuerdo a la base de datos *miRBase Release 21* [114].

Materiales y Métodos

El análisis de los perfiles de expresión y de la expresión diferencial se realizó en el entorno R/*Bioconductor* [150], usando la función específica *featureCounts* [151] y el paquete *edgeR* [152].

Previamente a la búsqueda de los miARN maduros diferencialmente expresados en eosinófilos procedentes de ambas condiciones, la tabla de recuento se filtró para aquellas secuencias de miARN maduras no expresadas por encima de 1 cuenta por millón (cpm) de lecturas mapeadas en, al menos, cinco muestras. La normalización y la estimación de dispersión común se realizaron usando los parámetros por defecto de *edgeR*. Por último, y antes de la corrección de pruebas múltiples con una tasa de falsos descubrimientos (FDR) del 5%, se utilizaron los valores de la dispersión *Tagwise* en un test exacto mediante el método de la probabilidad máxima condicional ajustada por cuartiles, para evaluar las secuencias de los miARN expresadas diferencialmente entre ambas condiciones.

Finalmente, se obtuvo un listado de miARN, de los cuales algunos de ellos se encontraban diferencialmente expresados entre las condiciones sano y asma, cumpliendo determinadas premisas: un valor p (p) y un FDR menor a 0,05.

3.10.2. Confirmación de miARN de eosinófilos

3.10.2.1. Síntesis de ADN complementario

Las muestras de miARN procedentes de los eosinófilos y de los exosomas de eosinófilos, se ajustaron a una concentración de 5 ng/ μ L, para utilizar una cantidad final de 20 ng.

La retrotranscripción a ADNc se realizó con el *Universal cDNA Synthesis kit II* (Exiqon, Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Veriti® 96-Well* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) con el siguiente programa de tiempos y temperaturas: 60 min a 42°C y 5 min 92°C. En todas las reacciones se añadió el *Synthetic RNA spike in SP6* (Exiqon, Qiagen) como control interno de la reacción.

3.10.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real de miARN

Una vez obtenido el ADNc, este se diluyó con agua libre de nucleasas en una proporción de 1:80. Esta dilución se preparó en el momento de realizar la RT-qPCR.

La RT-qPCR se llevó a cabo mediante el kit *ExiLENT SYBR® Green Master Mix* (Exiqon, Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada reacción se hizo en un volumen final de 10 μ L de una mezcla de reacción constituida por 5 μ L de *Master Mix*, 1 μ L de cebador y 4 μ L de la dilución 1:80 de ADNc. Todas las reacciones se realizaron por triplicado. Los cebadores correspondientes a cada miARN evaluado, fueron comprados a la casa comercial Exiqon (Qiagen), cuyas secuencias se corresponden con las secuencias disponibles en la base de datos *miRBase* [114,153]. Todos ellos tienen una eficiencia igual a 2. En la Tabla 5 se detalla el listado de los cebadores utilizados en la RT-qPCR.

miARN endógenos		
hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-191-5p	RNU6
miARN a evaluar		
hsa-miR-1-3p	hsa-miR-320a	hsa-miR-1260a
hsa-miR-21-5p	hsa-miR-320b	hsa-miR-1260b
hsa-miR-144-3p	hsa-miR-451a	hsa-miR-1290
hsa-miR-144-5p	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-4425
hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-590-3p	hsa-miR-4443
hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-629-5p	hsa-miR-4521
hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-664a-5p	hsa-miR-5100
hsa-miR-185-5p	hsa-miR-1246	hsa-miR-7977

Tabla 5. Cebadores utilizados en la RT-qPCR para la confirmación de los miARN con expresión diferencial descritos por secuenciación masiva entre los dos grupos de estudio.

La reacción se llevó a cabo en el termociclador *LightCycler® 96* (Roche, Basilea, Suiza) utilizando el siguiente programa:

- Pre-incubación: 1 ciclo de 10 min a 95°C.
- Amplificación (2 pasos): 45 ciclos de 10 seg 95°C y 1 min 60°C.
- *Melting*: 1 ciclo de 5 seg 95°C, 1 min 65°C y 1 seg 97°C.

Los resultados fueron analizados mediante el *software* informático *LightCycler® 96 SW 1.1* (Roche).

3.10.3. Análisis bioinformático

Para el análisis de grupos, construcción de gráficos de análisis de componentes principales (PCA) y *heatmaps* se utilizó la herramienta *ClustVis* [154]. Esta herramienta utiliza el análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado.

3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las características clínicas y demográficas de los pacientes se definieron usando estadísticos descriptivos, siendo expresadas como la mediana y el rango, la media aritmética \pm DE y el rango o el porcentaje.

El resto de los resultados se encuentran expresados como la media \pm DE.

Las comparaciones estadísticas entre un grupo y un valor constante (como en el caso de las medidas de cambio en varios parámetros, cuando el control toma el valor 1) se realizaron mediante el test de Wilcoxon para los datos no paramétricos y mediante la prueba *t* de Student para muestras con datos paramétricos.

La comparación entre dos grupos con datos no paramétricos se realizó mediante el test de Mann-Whitney. En relación a los datos paramétricos, se utilizó la prueba *t* de Student para grupos no

Materiales y Métodos

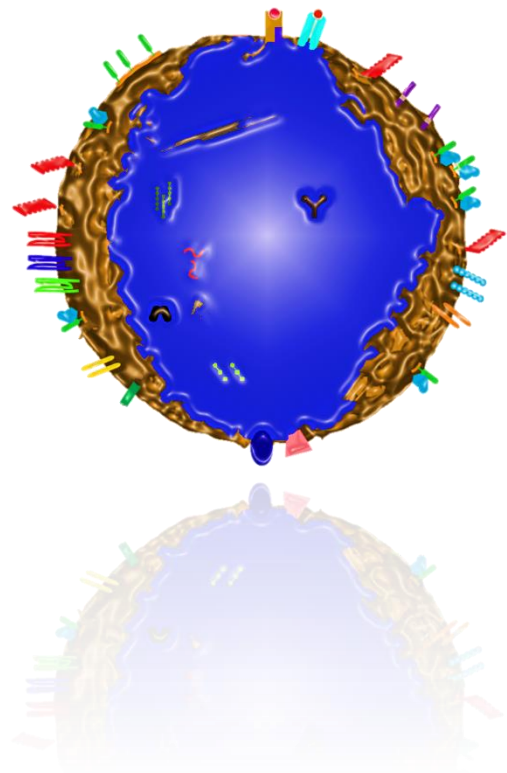
pareados con igual desviación estándar entre los datos, o la prueba t de Student para grupos no pareados con corrección Welch para aquellos grupos que tenían diferentes desviaciones estándar entre los datos.

Para comparaciones entre 3 o más grupos con datos paramétricos se utilizó el test ANOVA con un test posterior de comparaciones múltiples de Bonferroni. Para la realización de las comparaciones entre 3 o más grupos con datos no paramétricos, el contraste estadístico utilizado fue el test de Kruskal-Wallis con un test posterior de comparaciones múltiples de Dunn.

La normalidad de los datos se determinó por el test estadístico de Shapiro-Wilk cuando el tamaño muestral era menor o igual a 50. En el resto de casos ($n > 50$) la normalidad se evaluó mediante el test estadístico de Kolmogorov-Smirnov. El grado de significación estadística aplicado es $p < 0,05$ (se aceptó como máximo una probabilidad de error no superior al 5%).

Todos los test estadísticos utilizados son pruebas estadísticas bilaterales.

El análisis estadístico realizado en el presente estudio se llevó a cabo por medio de los programas informáticos *GraphPad InStat 3* y *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, Estados Unidos).



4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS DE LOS INDIVIDUOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

El estudio se realizó en un total de 103 individuos, de los cuales 77 cumplían con el criterio de diagnóstico de asma y 26 fueron controles sanos. En la Tabla 6 se recogen las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes del estudio.

	Sanos (<i>n</i> = 26)	Asma (<i>n</i> = 77)	Valor <i>p</i>
Edad (Años)^a	32,81 ± 6,55 (25-51)	36,01 ± 8,95 (17-52)	> 0,05
Hombres (%)	8 (30,77)	14 (18,18)	> 0,05
Atopia (%)	7 (26,92)	65 (84,42)	< 0,0001
Hábito tabáquico			
Fumador (%)	2 (7,69)	10 (12,99)	> 0,05
Exfumador (%)	2 (7,69)	11 (14,29)	> 0,05
No fumador (%)	22 (84,62)	56 (72,72)	> 0,05
FEV₁ (%)^b	ND	93,80 (49,30-128,30)	
FEV₁/FVC (%)^b	ND	78,58 (56,70-93,53)	
FeNO (ppb)^b	ND	34,2 (5,69-148)	
IgE sérica total (kU/L)^b	ND	137,4 (5,67-6997)	
Eosinofilia (%)^a	< 3	5,29 ± 2,33 (2,00-10,30)	< 0,0001

Tabla 6. Características clínicas y epidemiológicas de los sujetos del estudio. FeNO, fracción exhalada de óxido nítrico; FEV₁, volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC, capacidad vital forzada; ND, no disponible. ^aMedia aritmética ± DE (rango); ^bmediana (rango).

Los individuos se encuentran dentro de un rango intermedio de edad, entre 17 y 52 años. Aunque el grupo control tiene un menor promedio de edad, no existen diferencias significativas entre ambos grupos poblacionales.

Con respecto al género, en ambos grupos son mayoritarias las mujeres, no existiendo diferencias entre ellos ($p > 0,05$).

En relación a la atopia, se observa un mayor porcentaje de individuos atópicos en el grupo de los asmáticos, existiendo diferencias estadísticamente significativas con el grupo control ($p < 0,0001$).

La mayoría de los individuos no son fumadores, aunque existe un porcentaje de sujetos fumadores o exfumadores en ambos grupos de estudio. El análisis estadístico reveló que no existen diferencias entre las dos poblaciones ($p > 0,05$).

En cuanto a los datos que se derivan de la función pulmonar y los relativos a la determinación de la IgE sérica total, solo fue posible disponer de los datos del grupo de pacientes asmáticos. Como se puede observar, el valor de FEV₁/FVC (cociente entre volumen máximo espirado en el primer segundo de una espiración forzada y la capacidad vital forzada) es superior al 70%. Además, la

Resultados

fracción exhalada de óxido nítrico (FeNO) es inferior a 50 ppb. Estos dos parámetros se encuentran dentro del rango de normalidad, según las directrices recogidas en las versiones 4.0 y 4.2 de la Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA) [136]. También se aprecia que el nivel de IgE total detectado en el suero de los pacientes con asma es elevado (137,4 kU/L).

El porcentaje de eosinófilos en sangre periférica fue superior en los individuos asmáticos respecto a los sujetos sanos ($5,29 \pm 2,33\%$ *vs.* $< 3\%$; $p < 0,0001$).

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXOSOMAS PROCEDENTES DE EOSINÓFILOS

Para comenzar el estudio se determinó si los eosinófilos poseen cuerpos multivesiculares (MVB), que son las estructuras precursoras de los exosomas.

4.2.1. Identificación de cuerpos multivesiculares en los eosinófilos

Para definir la existencia de MVB en eosinófilos se examinó la presencia de CD63 y del LBPA en estas estructuras. Los experimentos se realizaron en 6 muestras diferentes de pacientes asmáticos, analizando 20 eosinófilos por cada muestra mediante microscopía confocal.

En la Figura 14 se visualiza la inmunorreactividad positiva de las moléculas CD63 (verde) y LBPA (rojo), existiendo co-localización en algunas zonas (amarillo). Esto indica la presencia de endosomas (CD63⁺), los cuales corresponden con MVB maduros (LBPA⁺).

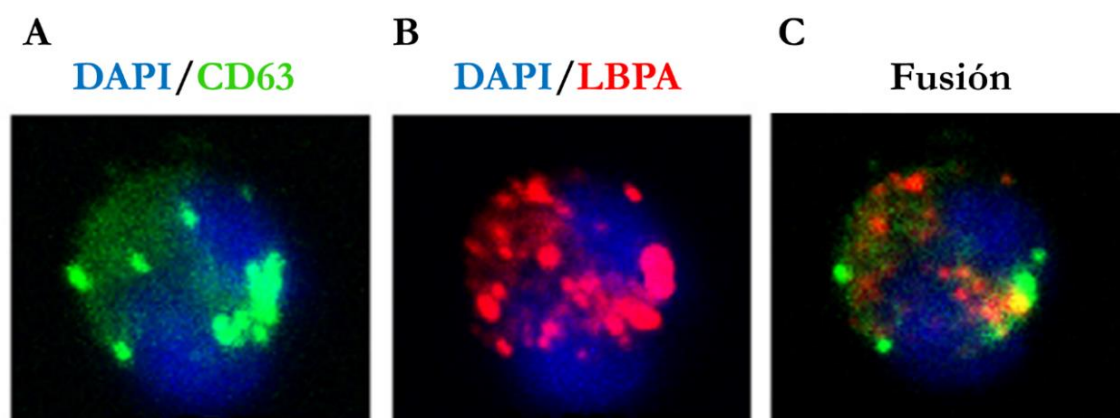


Figura 14. Microscopía confocal de los cuerpos multivesiculares de eosinófilos. Imágenes representativas de un eosinófilo procedente de un paciente asmático con marcaje intracelular CD63⁺ (verde) (A) y LBPA⁺ (rojo) (B). La imagen de fusión (C) representa la superposición de ambas y el color amarillo indica que el marcaje es coincidente en el espacio para ambas moléculas.

Para reafirmar la presencia de MVB, se analizaron eosinófilos ($n = 44$) procedentes de 10 pacientes asmáticos por medio de microscopía electrónica de transmisión.

Como se puede apreciar en la Figura 15A, existe inmunomarcaje LBPA⁺ en el interior del eosinófilo indicado por las puntas de flecha negras. También se observó la invaginación de la membrana limitante de los MVB para formar las vesículas intraluminales (ILV), indicado mediante las puntas de

flecha negra de la Figura 15B. En la Figura 15C se observa en detalle la fusión de un MVB con la membrana plasmática secretando las vesículas que contiene, las cuales poseen un tamaño y morfología compatibles con los exosomas.

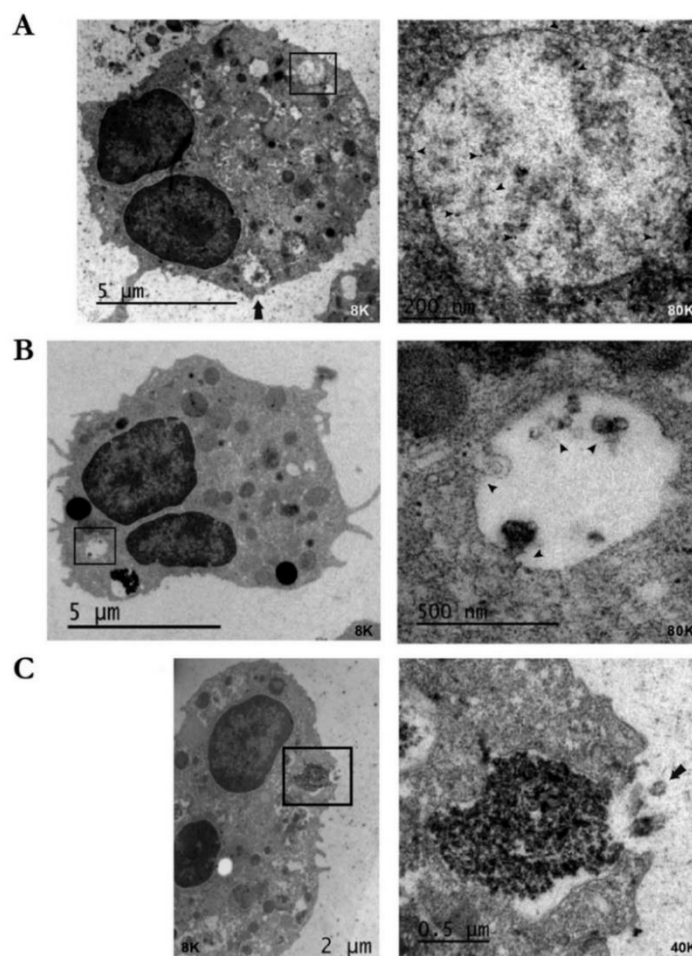


Figura 15. Microscopía electrónica de transmisión de los cuerpos multivesiculares de eosinófilos. **A.** Aumento de 8.000X de un eosinófilo. En la imagen izquierda, la flecha indica la presencia de MVB y el rectángulo detalla un MVB seleccionado. En la imagen derecha (aumento de 80.000X) las puntas de flecha indican la presencia del LBPA. **B.** Aumento de 8.000X de un eosinófilo (imagen izquierda). El rectángulo detalla un MVB maduro (aumento de 80.000X), como se observa en la imagen derecha, donde las puntas de flecha indican el proceso de formación de invaginaciones de los MVB, también denominadas ILV. **C.** Aumento de 8.000X de un eosinófilo. En la imagen izquierda, el rectángulo señala la fusión de un cuerpo multivesicular con la membrana plasmática, la cual se observa más en detalle con el aumento de 40.000X (imagen derecha). La flecha indica la presencia de una vesícula extracelular con las características de un exosoma. Estas imágenes representativas pertenecen a 3 eosinófilos de un total de 44 eosinófilos analizados procedentes de 10 pacientes asmáticos diferentes.

Todos estos resultados demuestran que los eosinófilos, dentro de su diversidad granular, cuentan con MVB que generarían exosomas.

4.2.2. Movilización de los gránulos intracelulares, secreción y caracterización de exosomas

El siguiente paso fue determinar la movilización de los gránulos intracelulares de los eosinófilos, como etapa previa a la liberación de exosomas.

Resultados

4.2.2.1. Movilización de gránulos intracelulares inducida por IFN- γ

Los eosinófilos transfectados con el plásmido pEFGFP-C1bosCD63, que contenía la proteína de fusión GFP-CD63, se estimularon con IFN- γ ($n = 3$) y se estudió el comportamiento de las vesículas intracelulares GFP-CD63⁺ mediante ensayos de *time-lapse*. Como control se utilizaron eosinófilos sin estimular ($n = 7$).

En los ensayos de *time-lapse* se determinó un aumento de la fluorescencia de GFP-CD63⁺ en la membrana plasmática entre los 8 y 10 min posteriores a la estimulación con IFN- γ , como se observa en las Figuras 16A y 16B. Esto implica una movilización de los gránulos desde el citoplasma hasta la membrana para fusionarse con ella.

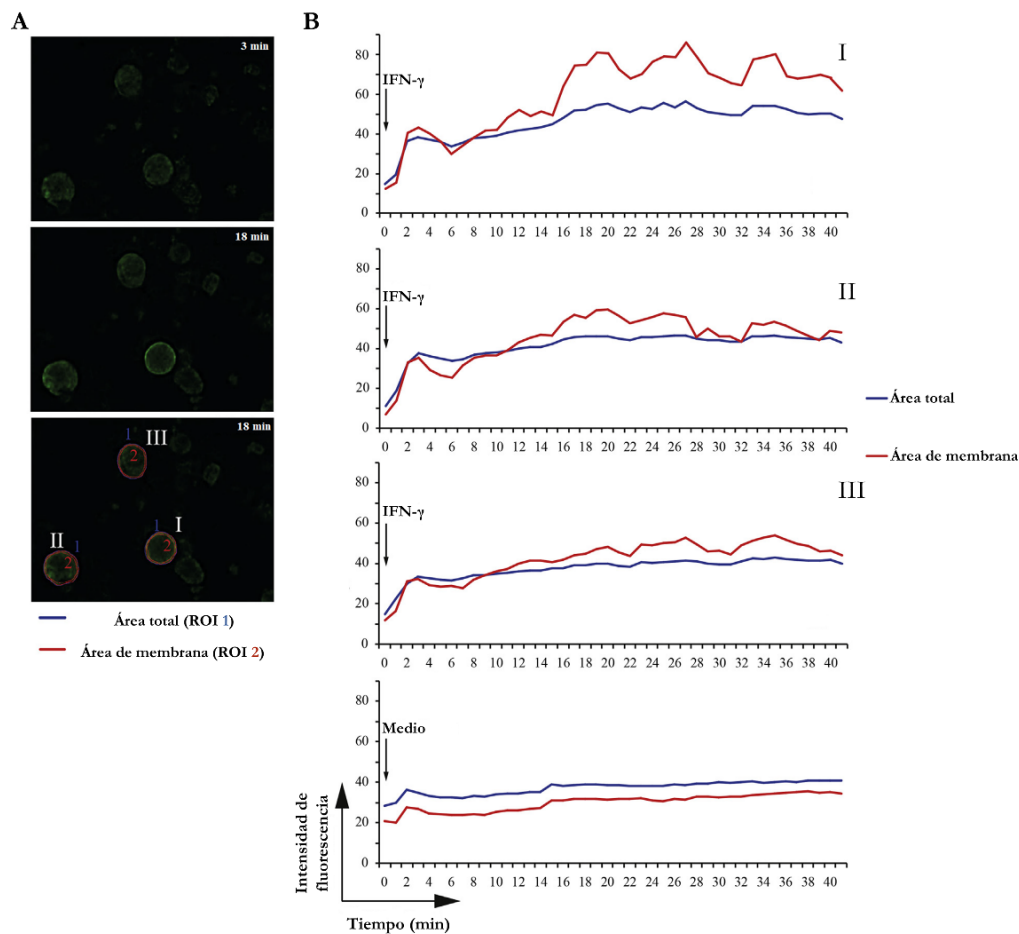


Figura 16. Movilización de los gránulos de eosinófilos. **A.** Imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia de eosinófilos transfectados viables a diferentes tiempos (3 min y 18 min). **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia, producida por la GFP-CD63, de eosinófilos estimulados con IFN- γ y sin estimular (medio). Las figuras representan la intensidad de fluorescencia de dos regiones de interés (ROI) definidas: área total celular (ROI 1) y área de la membrana plasmática (ROI 2).

Al cuantificar la fluorescencia producida por el LBPA en eosinófilos estimulados y sin estimular con IFN- γ a diferentes tiempos ($n = 50$), se observó una fluorescencia menor en los eosinófilos estimulados en comparación a los eosinófilos sin estimular en todos los puntos temporales ($p < 0,05$; Fig. 17). También se aprecia una disminución progresiva de dicha fluorescencia a medida que aumentó el tiempo evaluado.

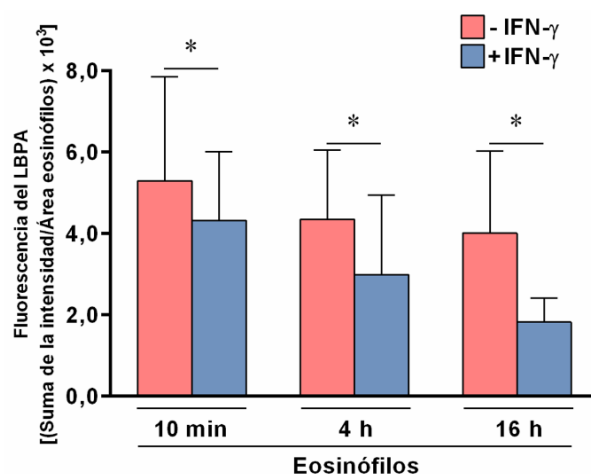


Figura 17. Fluorescencia producida por el LBPA en eosinófilos. Se cuantificó dicha fluorescencia por microscopía de epifluorescencia. * $p < 0,05$.

Estos resultados se corroboraron mediante citometría de flujo, cuantificando la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD63 y del LBPA tras la estimulación de los eosinófilos con IFN- γ ($n = 3$) o sin ella ($n = 3$), como se representa en la Figura 18. Se observó una disminución de la IMF de ambas moléculas después de 10 min tras la estimulación con IFN- γ ($p > 0,05$), indicando que esta citocina promueve una movilización de los MVB desde el citoplasma hasta la membrana plasmática.

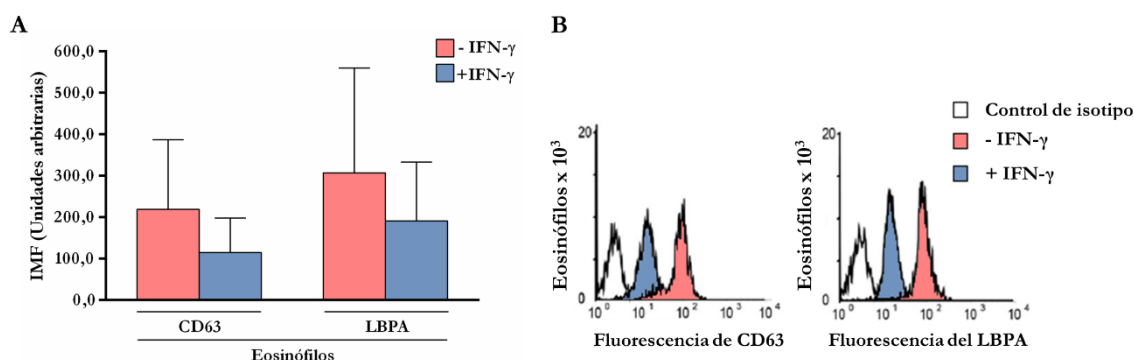


Figura 18. Presencia de CD63 y del LBPA en los eosinófilos. **A.** Cuantificación de la fluorescencia de CD63 y del LBPA intracelular en las células estimuladas durante 10 min con IFN- γ o sin estimular. **B.** Histogramas representativos de citometría de flujo de la variación de la intensidad de fluorescencia de CD63 y del LBPA en eosinófilos estimulados o no con IFN- γ . También se observa el control de isotipo.

4.2.2.2. Secreción y caracterización de los exosomas de eosinófilos

El siguiente objetivo fue demostrar la secreción de exosomas al medio extracelular, así como su caracterización desde un punto de vista morfológico y molecular.

4.2.2.2.1. Análisis de proteínas exosomales y regulación de la secreción de exosomas

Las proteínas CD9, ALIX y CD63, que son características de exosomas, se analizaron por *western blot* en lisados exosomales procedentes de eosinófilos de pacientes asmáticos cultivados con IFN- γ , eotaxina-1, o sin estímulos ($n = 3$).

En el *immunoblot* de la Figura 19, se visualizan bandas que se corresponden, por su peso molecular,

Resultados

con las proteínas ALIX (95 kDa), CD63 (53 kDa) y CD9 (27 kDa). En el densitometrado se observó un aumento en la intensidad de todas las bandas analizadas en las muestras de exosomas procedentes de eosinófilos estimulados con IFN- γ ($p > 0,05$), indicando una mayor secreción de exosomas cuando los eosinófilos están en presencia de dicha citocina.

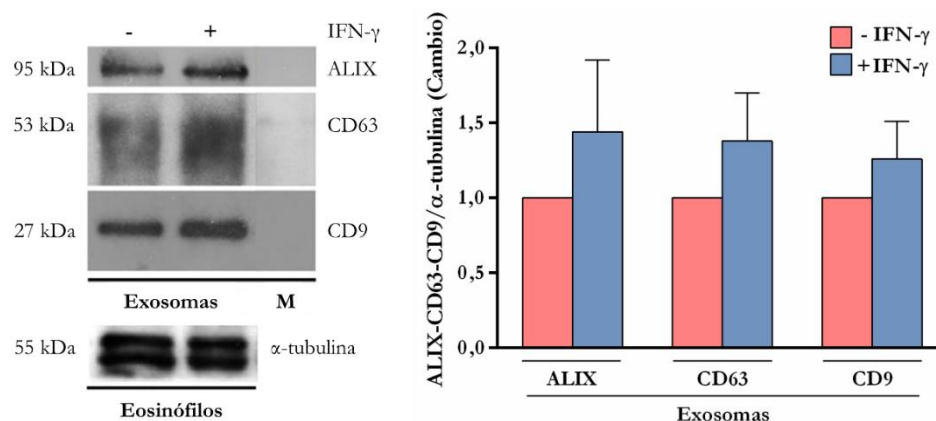


Figura 19. Inmunodetección de ALIX, CD63 y CD9 en lisados de exosomas. *Western blot* de muestras de exosomas obtenidos tras la estimulación de los eosinófilos de pacientes asmáticos durante 10 min con IFN- γ (+) o sin ella (-), y densitometrado de las bandas. El medio con los exosomas eliminados (M) se utilizó como control de condiciones en ausencia de exosomas. Los niveles de expresión proteicos se normalizaron frente a la expresión de la α -tubulina.

Como se aprecia en la Figura 20, al analizar las mismas moléculas en exosomas de eosinófilos estimulados con eotaxina-1, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las proteínas analizadas. Con estos datos se deduce que, en contraposición al IFN- γ , la eotaxina-1 no induce la liberación de exosomas.

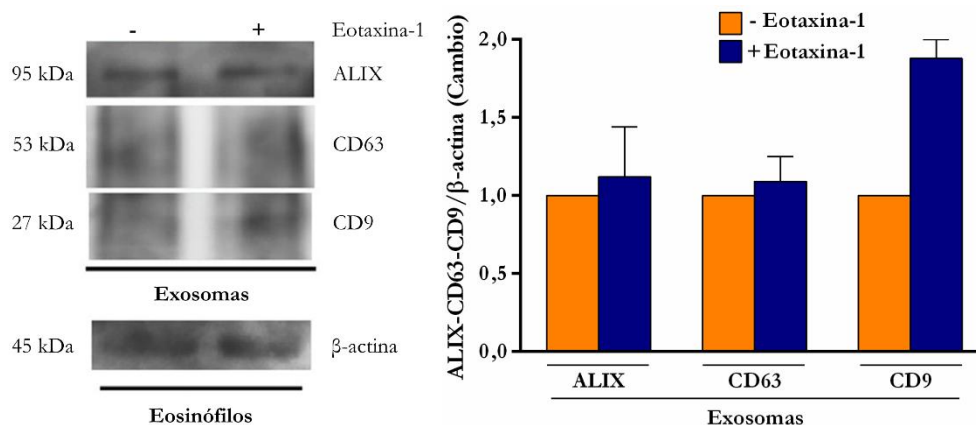


Figura 20. Inmunodetección de ALIX, CD63 y CD9 en exosomas. *Western blot* de lisados de exosomas obtenidos después de la estimulación de los eosinófilos de pacientes asmáticos durante 1 h con eotaxina-1 (+) o sin ella (-), y densitometrado de las bandas. La β -actina se utilizó como control de carga.

Para constatar si dicha secreción es un proceso regulado activamente o solamente inducido, se realizaron ensayos de inhibición de la activación de la proteína quinasa C (PKC) utilizando Gö6985 ($n = 3$).

Como se observa en la Figura 21, en estas condiciones de inhibición, la secreción de exosomas (establecida como la expresión de las proteínas exosomales CD9 y ALIX) experimenta una ligera

reducción comparada tanto con la de las células sin tratar como con la observada en las células estimuladas con IFN- γ ($p > 0,05$).

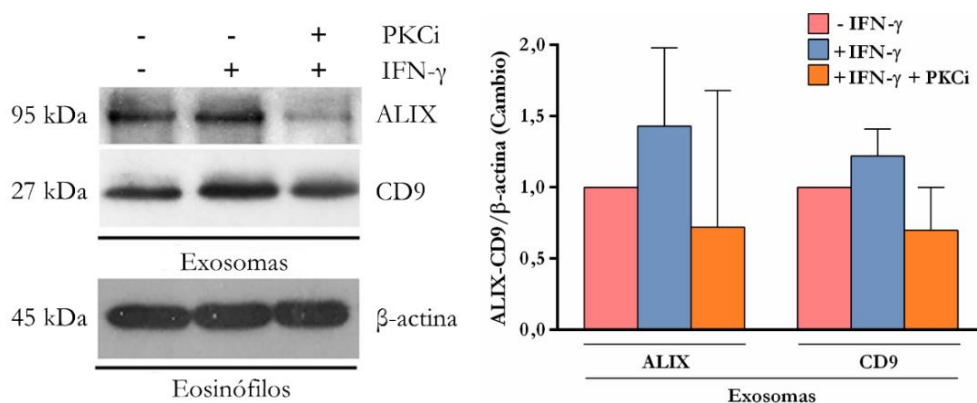


Figura 21. Regulación de la secreción de los exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos. *Western blot* de ALIX y CD9 de lisados de exosomas procedentes de eosinófilos tras la estimulación o no con IFN- γ durante 10 min, o después de la inhibición de su secreción con el Gö6985 (PKCi) durante 20 min. La β -actina se utilizó como control de carga.

En resumen, la presencia de ALIX, CD63 y CD9 en las nanovesículas liberadas por los eosinófilos permite confirmar el origen endosomal de las mismas y, por tanto, su definición como exosomas. Además, la secreción de exosomas no es solo un proceso inducido, sino que también está regulado, entre otros factores, por la PKC.

4.2.2.2.2. Caracterización de los exosomas

La morfología y el tamaño de los exosomas de eosinófilos, procedentes de 6 pacientes asmáticos, se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión.

Como se visualiza en la Figura 22, las vesículas tienen forma de copa, doble membrana y un diámetro entre 30-100 nm, lo que se corresponde con las características morfológicas de los exosomas previamente descritos en otras células. Además, se observa el inmunomarcaje positivo para las moléculas ALIX y CD63 (indicado por las flechas blancas), lo que confirma que estas vesículas son exosomas.

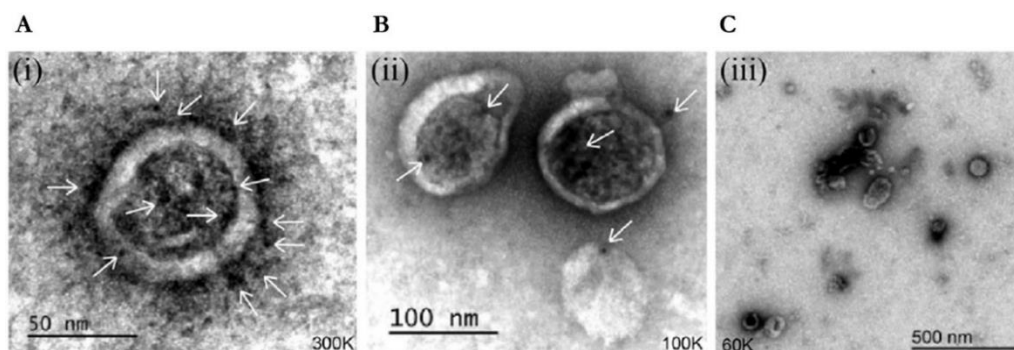


Figura 22. Microscopía electrónica de transmisión de exosomas de eosinófilos. A-C. Imágenes representativas de la ultraestructura característica de los exosomas. Las flechas blancas indican inmunorreactividad positiva para CD63 y ALIX.

Para corroborar el tamaño de las nanovesículas, los exosomas se analizaron utilizando un *NanoSight*

Resultados

LM10. Teniendo en cuenta la relevancia y el papel que juegan los eosinófilos en la patología asmática, se decidió investigar si la producción de exosomas es una característica de los eosinófilos procedentes de los pacientes asmáticos o también son producidos por los eosinófilos de sujetos sanos.

Como se aprecia en la Figura 23, ambos tipos de eosinófilos secretan exosomas y el tamaño de los exosomas procedentes de individuos sanos ($n = 9$) y de sujetos asmáticos ($n = 20$) fue similar en ambas muestras ($175,33 \pm 5,03$ nm y $176,85 \pm 22,54$ nm, respectivamente; $p > 0,05$). El pico único de los gráficos indica que el tamaño es homogéneo.

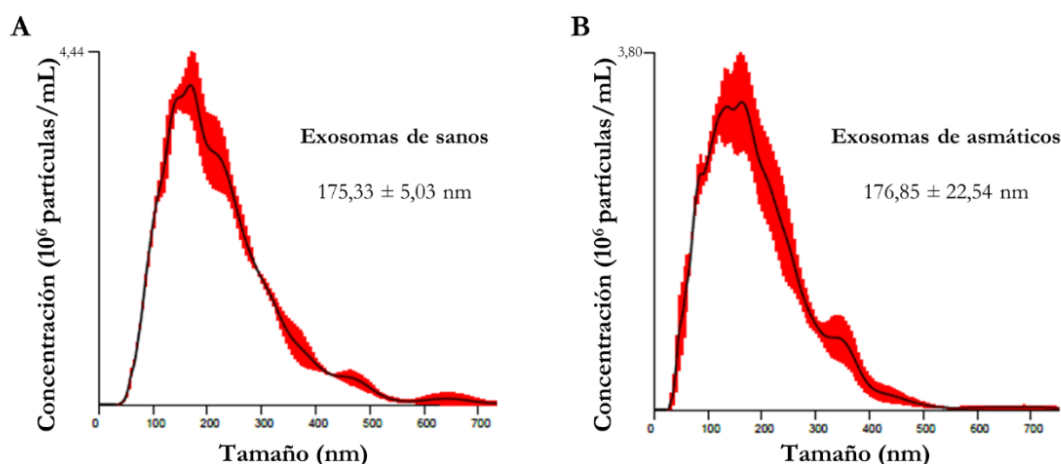


Figura 23. Tamaño de los exosomas. Histogramas representativos de muestras de exosomas procedentes de eosinófilos de sujetos sanos (A) y de pacientes asmáticos (B) donde se refleja el tamaño de estas nanovesículas.

Al examinar la cantidad de exosomas producidos, se constató que los eosinófilos de pacientes asmáticos ($n = 20$) producían más exosomas que los eosinófilos de sujetos sanos ($n = 9$; $11,73 \times 10^8 \pm 5,03 \times 10^8$ vs. $3,84 \times 10^8 \pm 1,21 \times 10^8$ exosomas/mL; $p < 0,0001$; Fig. 24A).

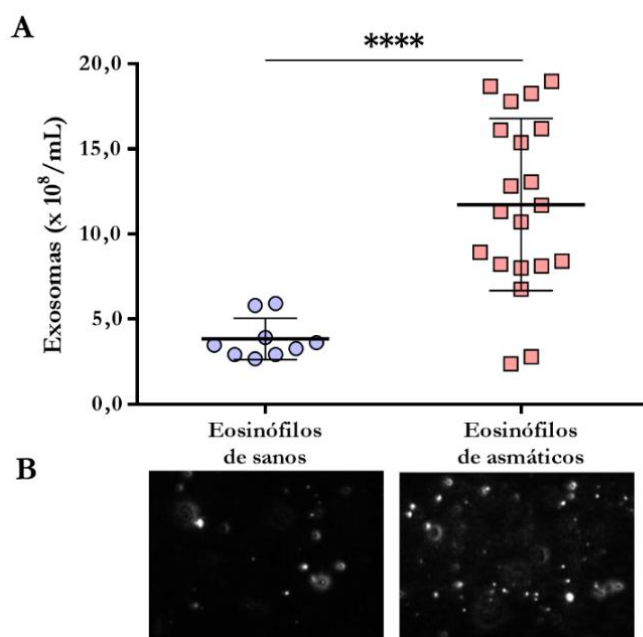


Figura 24. Cuantificación de la secreción exosomas. A. Concentración de exosomas procedentes de eosinófilos de individuos sanos y de pacientes asmáticos determinada mediante un *Nanosight LM10*. B. Imágenes representativas tomadas con el *Nanosight LM10* de los exosomas secretados por los eosinófilos de sujetos sanos (izquierda) y de pacientes asmáticos (derecha). **** $p < 0,0001$.

En la Figura 24B se observan dos fotografías tomadas con la cámara del *NanoSight LM10*, en las que se aprecia que la cantidad de exosomas de la muestra de pacientes asmáticos (imagen derecha) es superior a la de exosomas de sujetos sanos (imagen izquierda).

4.2.2.3. Perfil proteico de los exosomas de eosinófilos

Se procedió a estudiar las proteínas de los exosomas procedentes de sujetos sanos y de pacientes asmáticos, realizando una aproximación cualitativa, por medio de dos técnicas: *western blot* y proteómica de exosomas mediante espectrometría de masas.

4.2.2.3.1. Identificación de proteínas características de eosinófilos en lisados exosomales

El análisis de las proteínas clásicas del eosinófilo se realizó mediante *western blot* en muestras de exosomas de 3 pacientes asmáticos y de 3 individuos sanos.

Como se observa en la Figura 25, tanto los exosomas de individuos sanos como los de pacientes asmáticos contienen EPO, MBP y ECP, indicando su origen eosinofílico. También se aprecian diferentes intensidades de señal de banda entre las distintas muestras, lo cual podría indicar que no todos los eosinófilos liberan exactamente la misma cantidad de exosomas.

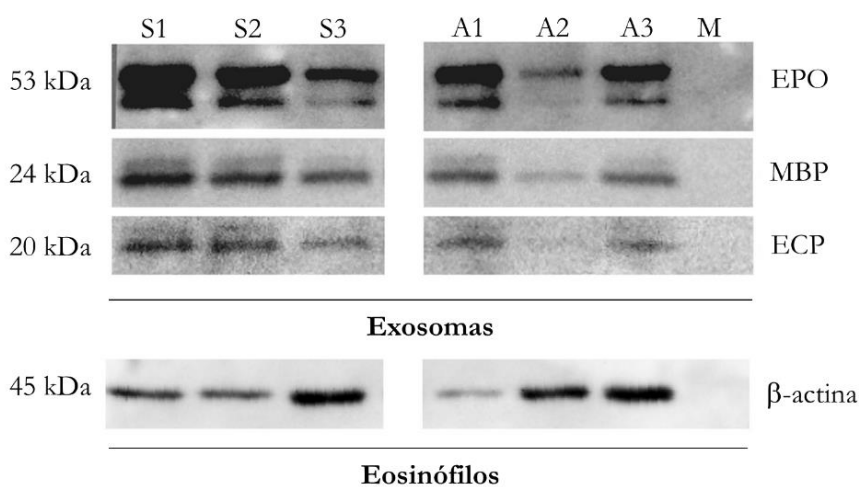


Figura 25. Identificación de proteínas de origen eosinofílico en exosomas. *Western blot* de lisados de exosomas de sujetos sanos (S1-S3) y de pacientes asmáticos (A1-A3). El medio con los exosomas eliminados (M) se utilizó como control de condiciones en ausencia de exosomas. La β -actina se empleó como control endógeno y de carga.

4.2.2.3.2. Análisis del contenido proteico de los exosomas

La aproximación cualitativa del perfil proteico exosomal se realizó, mediante espectrometría de masas, en muestras de exosomas de pacientes asmáticos ($n = 8$) y de individuos sanos ($n = 7$). Se detectó un total de 105 proteínas exosomales, de las cuales 25 eran únicas de pacientes con asma, 12 eran exclusivas de individuos sanos y 68 eran comunes en ambos grupos.

Entre las proteínas comunes se encontraron las proteínas clásicas del eosinófilo (ECP, EPO, MBP y EDN), ratificando el origen eosinofílico de estos exosomas. También se identificaron otras proteínas

Resultados

relacionadas con el proceso asmático (como la periostina o la proteína del canal de cloro intracelular 1), moléculas características de los exosomas (HSP70, anexina A1 y A5), proteínas del citoesqueleto (actina, tubulina, cofilina y moesina) y enzimas (piruvato quinasa y alfa-enolasa). Estas proteínas se asocian a diferentes funciones biológicas: migración, adhesión, señalización celular, estrés oxidativo, inflamación, metabolismo celular y otros grupos funcionales (Fig. 26). En la Tabla 9 (Anexo I) se encuentra el listado completo de las proteínas halladas en los exosomas.

Proteínas exosomales comunes

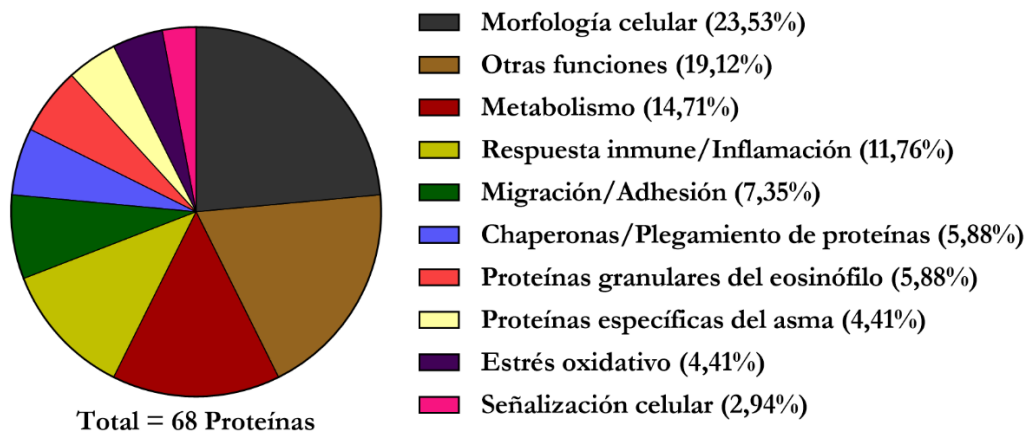


Figura 26. Distribución, de acuerdo a su función biológica, de las proteínas comunes identificadas en los exosomas de ambos grupos. Las funciones se asignaron basándose en la base de datos *UniProtKB* y en los artículos científicos previamente publicados [155,156].

A la luz de todos estos resultados se demuestra, por primera vez, la capacidad de los eosinófilos para secretar exosomas, siendo esta secreción mayor en los eosinófilos procedentes de pacientes asmáticos. También se ha descrito la composición proteica de dichos exosomas, nunca antes definida. Todo esto plantea la hipótesis de la potencial contribución de los exosomas derivados de eosinófilos al desarrollo y mantenimiento de los síntomas asociados a la patobiología del asma.

4.3. PAPEL DE LOS EXOSOMAS EN LA FUNCIONALIDAD DE LOS EOSINÓFILOS

El siguiente objetivo fue determinar los efectos que ejercen estos exosomas, tanto de eosinófilos de pacientes asmáticos como de individuos sanos, sobre las principales células efectoras en el asma: los eosinófilos.

4.3.1. Efectos de los exosomas en la apoptosis de los eosinófilos

Para examinar si los exosomas actúan de una manera autocrina en la supervivencia de los eosinófilos, se evaluó el porcentaje de eosinófilos apoptóticos tras su cultivo con o sin exosomas.

Tras 24 h en cultivo con los exosomas de pacientes asmáticos, se observó un ligero aumento dosis-dependiente en la apoptosis de los eosinófilos de individuos sanos y asmáticos, aunque en ningún caso este aumento fue significativo respecto al control sin exosomas ($p > 0,05$, $n = 5$; Fig. 27).

Como punto de referencia, se evaluó la apoptosis de eosinófilos recién purificados tanto de individuos sanos ($n = 4$) como de pacientes con asma ($n = 4$). Como se observa en la Figura 27, dicho porcentaje fue menor en los eosinófilos de origen asmático ($6,88 \pm 0,41\%$ *vs.* $17,08 \pm 5,34\%$, $p < 0,05$).

Al comparar los eosinófilos apoptóticos de ambas poblaciones tras 24 h en cultivo, se observó una apoptosis significativamente menor en los eosinófilos de sujetos asmáticos en dos condiciones: eosinófilos sin exosomas ($14,52 \pm 2,68\%$ *vs.* $30,42 \pm 11,47\%$; $p < 0,05$, $n = 5$) y eosinófilos con 6×10^6 exosomas/mL ($23,81 \pm 12,33\%$ *vs.* $47,62 \pm 16,93\%$; $p < 0,05$, $n = 5$; Fig. 27).

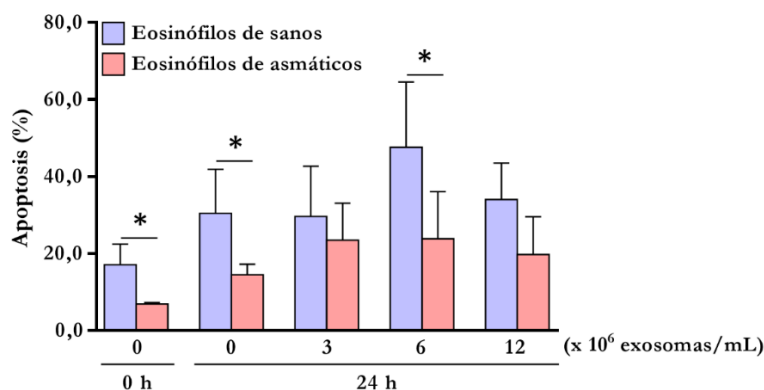


Figura 27. Apoptosis de eosinófilos de individuos sanos y asmáticos. Los eosinófilos apoptóticos de sujetos sanos y de pacientes asmáticos se evaluaron, mediante citometría de flujo, tras su purificación (0 h) o después del cultivo durante 24 h con medio ultracentrifugado (0 x 10⁶ exosomas/mL) o con diferentes dosis de exosomas procedentes de pacientes asmáticos. * $p < 0,05$.

Al estudiar el efecto de los exosomas de sujetos sanos en la apoptosis de eosinófilos de pacientes asmáticos, se observó que dicha apoptosis era similar a la obtenida con medio ultracentrifugado ($1,13 \pm 0,17$ veces; $p > 0,05$, $n = 6$; Fig. 28).

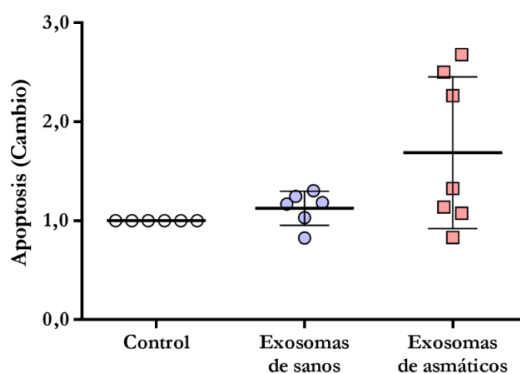


Figura 28. Apoptosis en los eosinófilos de pacientes con asma. Se determinó la apoptosis en eosinófilos, mediante citometría de flujo, tras su cultivo con medio ultracentrifugado (control) o con 6×10^6 exosomas/mL de individuos sanos o de pacientes asmáticos.

4.3.2. Adhesión y migración de los eosinófilos

Los procesos de adhesión y migración son claves para el reclutamiento de los eosinófilos desde el torrente sanguíneo hasta el foco inflamatorio, en los cuales juegan un papel esencial diferentes receptores y moléculas de adhesión. Por todo esto, se estudió el papel que desempeñan los exosomas en dichos procesos.

Resultados

4.3.2.1. Efecto de los exosomas en la capacidad de adhesión de los eosinófilos

Para estudiar el efecto de los exosomas en la adhesión de los eosinófilos de pacientes asmáticos, se analizó la actividad residual de la peroxidasa del eosinófilo, como medida indirecta de la adhesión.

Según se observa en la Figura 29, el incremento de la adhesión de los eosinófilos ocurrió de una manera dosis-dependiente, alcanzando sus niveles máximos cuando se utilizaron las concentraciones más altas de exosomas de pacientes asmáticos: 6×10^6 exosomas/mL ($1,37 \pm 0,23$ veces; $p < 0,05$, $n = 6$) y 12×10^6 exosomas/mL ($1,35 \pm 0,23$ veces; $p < 0,05$, $n = 6$).

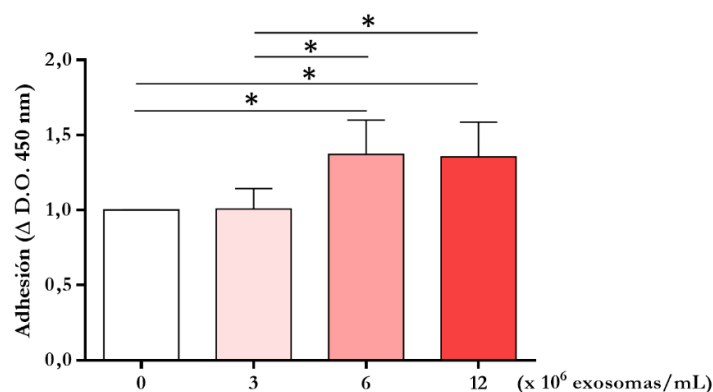


Figura 29. Adhesión de los eosinófilos tras su cultivo con exosomas de origen asmático. La adhesión se determinó de manera indirecta a través de la cantidad de EPO liberada por los eosinófilos (D.O. 450 nm) cultivados con diferentes dosis de exosomas o sin ellos. * $p < 0,05$.

Al analizar el efecto que producían los exosomas de individuos sanos, se observó que dichos exosomas no modificaban la adhesión respecto a las células incubadas sin exosomas ($1,12 \pm 0,23$ veces; $p > 0,05$, $n = 6$; Fig. 30).

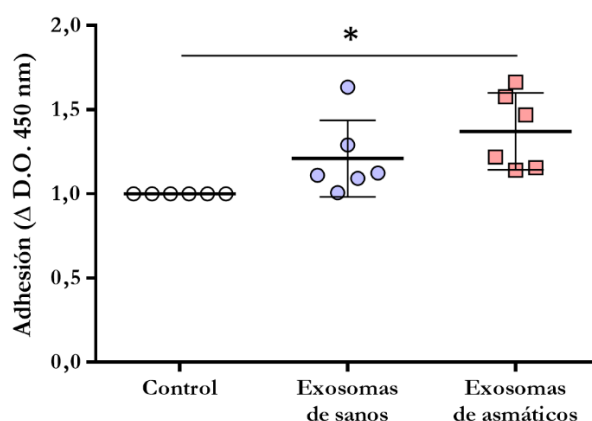


Figura 30. Adhesión de los eosinófilos de pacientes asmáticos tras su cultivo con exosomas. La adhesión se cuantificó indirectamente a través de la cantidad de EPO liberada por los eosinófilos (D.O. 450 nm) cultivados con medio ultracentrifugado (control) o con 6×10^6 exosomas/mL de sujetos sanos o de pacientes asmáticos. * $p < 0,05$.

4.3.2.2. Análisis de la migración de los eosinófilos inducida por los exosomas

Para definir el papel de los exosomas en el comportamiento migratorio de los eosinófilos, se realizaron dos tipos de ensayos diferentes: ensayos de quimiotaxis (movimiento celular dirigido hacia un estímulo determinado) y ensayos de quimioquinesis (el estímulo dispara la capacidad migratoria de

las células, las cuales adquieren un movimiento aleatorio pudiendo migrar a zonas donde no existen quimioatrayentes).

4.3.2.2.1. Quimiotaxis en eosinófilos

Como se observa en la Figura 31, los eosinófilos aumentaron significativamente su migración hacia los exosomas de pacientes asmáticos (6×10^6 exosomas/mL), respecto a la migración hacia el medio sin exosomas ($1,48 \pm 0,66$ veces; $p < 0,01$, $n = 16$).

Existió un aumento dosis-dependiente en la migración quimiotáctica hacia la eotaxina, alcanzando el nivel máximo de migración con 100 ng/mL de eotaxina ($1,54 \pm 0,33$ veces; $p < 0,05$, $n = 5$; Fig. 31).

Al evaluar la sinergia de las dosis de 6×10^6 exosomas/mL de pacientes asmáticos y de 100 ng/mL de eotaxina-1, no se encontraron cambios en la migración respecto a los estímulos evaluados de manera independiente ($1,33 \pm 0,24$ veces; $p > 0,05$, $n = 8$), aunque seguía existiendo un aumento en relación a los eosinófilos migrados hacia el medio sin exosomas ($p < 0,01$; Fig. 31).

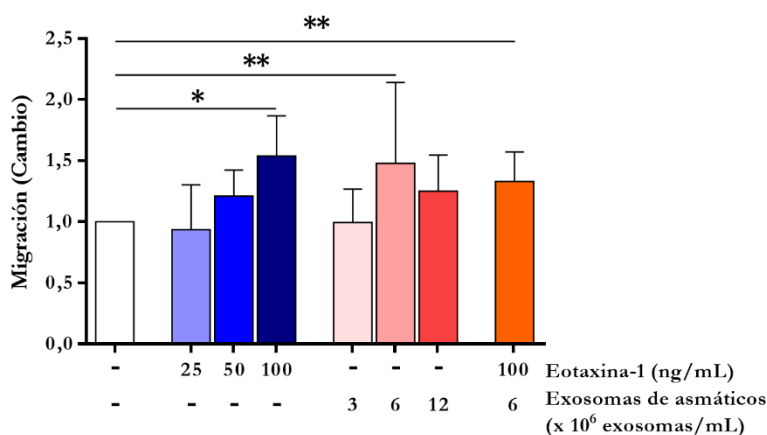


Figura 31. Migración de los eosinófilos de pacientes asmáticos hacia diferentes estímulos. Se determinó la migración de los eosinófilos hacia diferentes dosis de exosomas y/o eotaxina-1, la cual se utilizó como control de quimiotaxis. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Como se observa en la Figura 32, los exosomas procedentes de individuos sanos no ejercieron ningún cambio sobre la migración de los eosinófilos ($0,90 \pm 0,11$ veces; $p > 0,05$, $n = 6$).

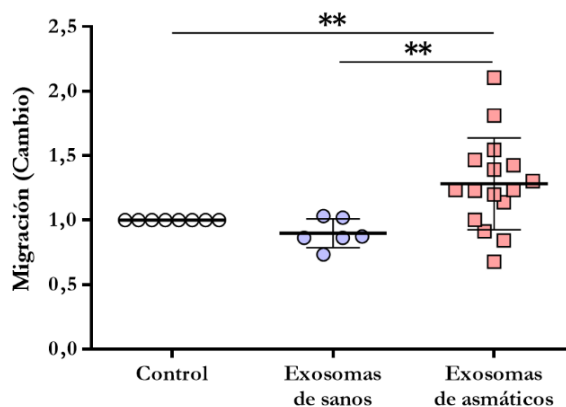


Figura 32. Migración quimiotáctica de los eosinófilos hacia los exosomas. Migración de los eosinófilos de pacientes asmáticos a través de una membrana con un poro de $0,5 \mu\text{m}$ hacia medio ultracentrifugado (control) o exosomas de individuos sanos o de pacientes asmáticos (6×10^6 exosomas/mL). ** $p < 0,01$.

Resultados

4.3.2.2.2. Quimiocinesis en eosinófilos

Mediante estos experimentos, se intentó discernir si los exosomas de pacientes asmáticos actúan también como agentes quimiocinéticos.

Los resultados demuestran que el número de eosinófilos que migraron hacia la parte inferior de los pocillos, tras la pre-incubación con 6×10^6 exosomas/mL, era similar al número de eosinófilos migrados y que habían sido pre-incubados con medio ultracentrifugado ($0,98 \pm 0,25$ veces; $p > 0,05$, $n = 8$; Fig. 33). También se confirmó que la migración quimiotáctica era superior a la migración quimiocinética ($p < 0,05$).

Además, el número de eosinófilos migrados, tras la pre-incubación de los eosinófilos con IL-5 y GM-CSF, fue superior respecto al control ($1,82 \pm 0,55$ veces; $p < 0,01$, $n = 4$) y respecto a los eosinófilos migrados después de la pre-incubación con exosomas ($p < 0,05$), confirmando el efecto quimiocinético de estos dos estímulos.

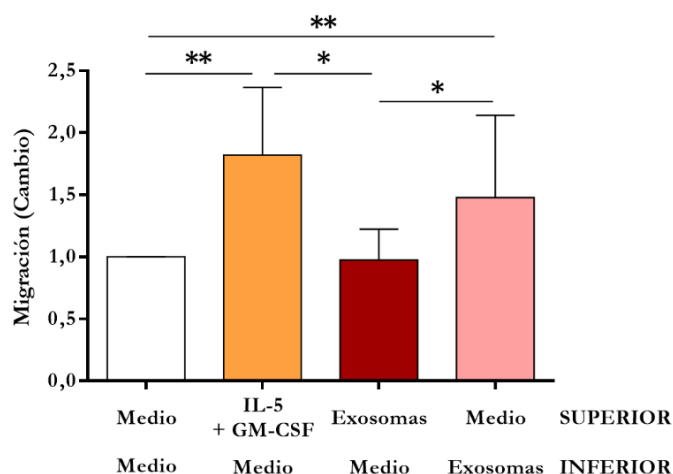


Figura 33. Migración quimiocinética y quimiotáctica de los eosinófilos de pacientes asmáticos. Se estudió el mecanismo de migración que producían los exosomas de origen asmático sobre los eosinófilos: quimiocinética (barra de color granate) o quimiotáctica (barra de color rosa). La IL-5 y el GM-CSF se utilizaron como control positivo de quimiocinesis. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.3.2.3. Papel de los exosomas sobre la expresión de moléculas de adhesión y de un receptor específico asociado a la migración

El aumento de la adhesión y de la migración podría producirse por el incremento de las moléculas de adhesión presentes en la superficie celular de los eosinófilos y de receptores específicos de quimioquinas. Por esta razón, se decidió estudiar la expresión de varias moléculas de adhesión y de un receptor de quimioquinas de la superficie de los eosinófilos tras la migración hacia los exosomas.

4.3.2.3.1. Moléculas de adhesión del eosinófilo

Tras la realización del ensayo de migración, se objetivó un aumento significativo del porcentaje de eosinófilos que expresaban la ICAM-1 ($21,00 \pm 12,16\%$ vs. $8,03 \pm 2,02\%$; $p < 0,01$, $n = 16$) y la integrina α_2 ($18,90 \pm 4,28\%$ vs. $12,13 \pm 2,72\%$; $p < 0,05$, $n = 6$) en aquellos que habían migrado hacia

los exosomas, en comparación con los eosinófilos migrados hacia el medio sin exosomas (Fig. 34).

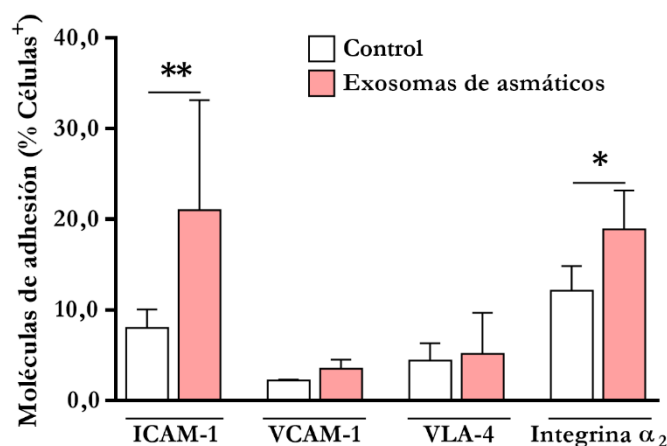


Figura 34. Expresión de moléculas de adhesión en eosinófilos de pacientes con asma. El porcentaje de eosinófilos migrados hacia el medio ultracentrifugado (control) o hacia los exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos (6×10^6 exosomas/mL), que expresan diferentes moléculas de adhesión, se determinó mediante citometría de flujo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.3.2.3.2. Efecto de los exosomas en la expresión de CCR3 en eosinófilos

Para evaluar si la migración inducida por los exosomas se encontraba modulada por el receptor de quimiocinas 3 (CCR3), se evaluó su expresión por citometría de flujo.

Como se observa en la Figura 35, el porcentaje de células positivas para CCR3 aumentó un 9% en los eosinófilos migrados hacia los exosomas de pacientes asmáticos en comparación con los eosinófilos migrados hacia el medio sin estímulos ($48,56 \pm 7,47\%$ vs. $39,30 \pm 4,87\%$; $p < 0,05$, $n = 5$). Esto podría vincular a CCR3 con el aumento observado de la migración de los eosinófilos hacia los exosomas.

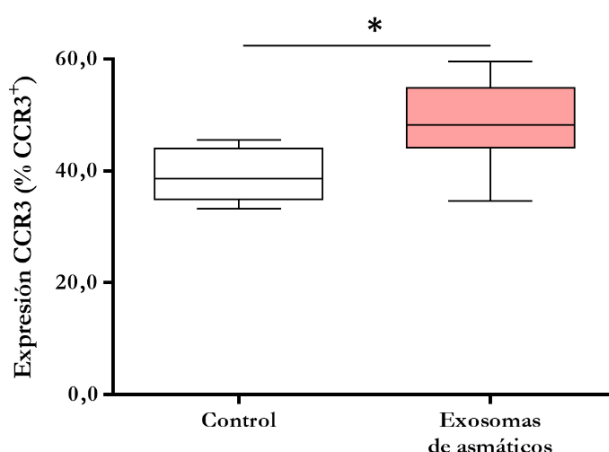


Figura 35. Expresión de CCR3 en eosinófilos de pacientes asmáticos. El porcentaje de expresión se analizó, mediante citometría de flujo, tras la migración de los eosinófilos hacia el medio ultracentrifugado (control) o hacia el medio con 6×10^6 exosomas/mL de individuos asmáticos. * $p < 0,05$.

En resumen, estos datos demuestran que los exosomas de individuos asmáticos aumentan la adhesión y la migración quimiotáctica de los eosinófilos de sujetos asmáticos, mediante el incremento de, al menos, algunas de estas moléculas de adhesión como ICAM-1 y la integrina α_2 , y del receptor de quimiocinas CCR3.

4.3.3. Papel de los exosomas en la producción de óxido nítrico (NO) y de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Debido al papel tan importante que juegan las ROS y el NO en la inflamación crónica característica del asma, se decidió estudiar si los exosomas contribuyen al aumento de la producción de estas moléculas.

4.3.3.1. Efecto de los exosomas en la producción de óxido nítrico

Al cuantificar los niveles de nitritos, como medida indirecta del NO, se observó que la incubación de los eosinófilos con 6×10^6 exosomas/mL de pacientes asmáticos inducía una mayor liberación de nitritos que la observada en los eosinófilos cultivados sin exosomas ($132,27 \pm 37,73 \mu\text{mol/L}$ *vs.* $67,71 \pm 15,16 \mu\text{mol/L}$; $p < 0,01$, $n = 8$; Fig. 36).

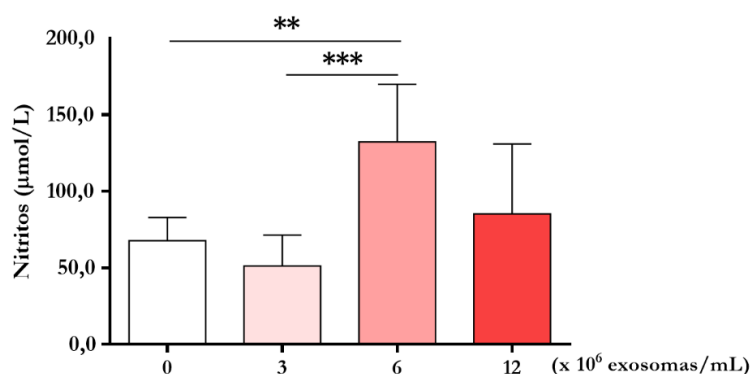


Figura 36. Producción de NO por los eosinófilos de sujetos asmáticos. La producción total de nitritos se determinó, mediante un método colorimétrico, en cultivos de eosinófilos con diferentes dosis de exosomas de sujetos asmáticos o sin exosomas. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Al evaluar el efecto que ejercen los exosomas de sujetos sanos en la producción de NO por parte de los eosinófilos, se observó que la concentración de nitritos fue ligeramente inferior a la obtenida en el control ($48,38 \pm 5,09 \mu\text{mol/L}$ *vs.* $67,71 \pm 15,16 \mu\text{mol/L}$; $p > 0,05$, $n = 5$; Fig. 37), y significativamente menor a la obtenida en los eosinófilos cultivados con exosomas de pacientes asmáticos ($p < 0,001$).

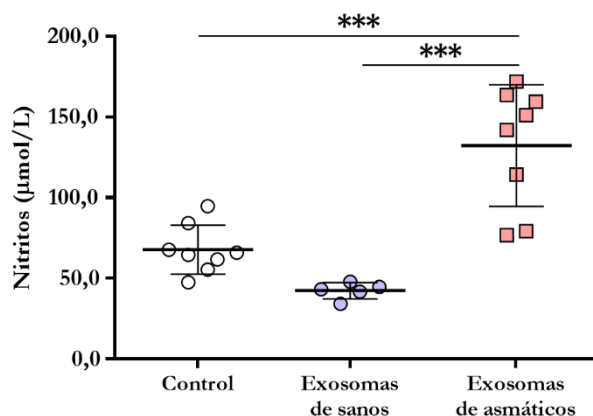


Figura 37. Producción de NO por parte de los eosinófilos de origen asmático tras la incubación con exosomas. La cantidad de NO se determinó como la cantidad de nitritos presentes en el sobrenadante del cultivo de eosinófilos incubados con medio ultracentrifugado (control) o con 6×10^6 exosomas/mL de eosinófilos purificados de individuos sanos o de pacientes asmáticos. *** $p < 0,001$.

4.3.3.2. Efecto de los exosomas en la liberación de especies reactivas de oxígeno

La producción de ROS se evaluó, mediante citometría de flujo, como la formación intracelular de peróxido de hidrógeno y radicales superóxido e hidroxilo.

Al comparar la intensidad media de fluorescencia (IMF) entre eosinófilos incubados con o sin exosomas de pacientes asmáticos, se observó un aumento en la producción de ROS con la dosis de 6×10^6 exosomas/mL ($1,53 \pm 0,43$ veces; $p < 0,01$; $n = 18$; Fig. 38A). Un incremento parecido se obtuvo tras añadir exosomas de sujetos sanos ($1,73 \pm 0,26$ veces; $p < 0,01$, $n = 5$; Fig. 38B).

En las Figuras 38C y 38D se visualizan dos histogramas representativos de citometría de flujo, donde se observa un claro desplazamiento del pico de fluorescencia hacia la derecha en aquellas células cultivadas en presencia de ambos tipos de exosomas, lo que indica un aumento en la intensidad de fluorescencia debido al aumento en la producción de ROS.

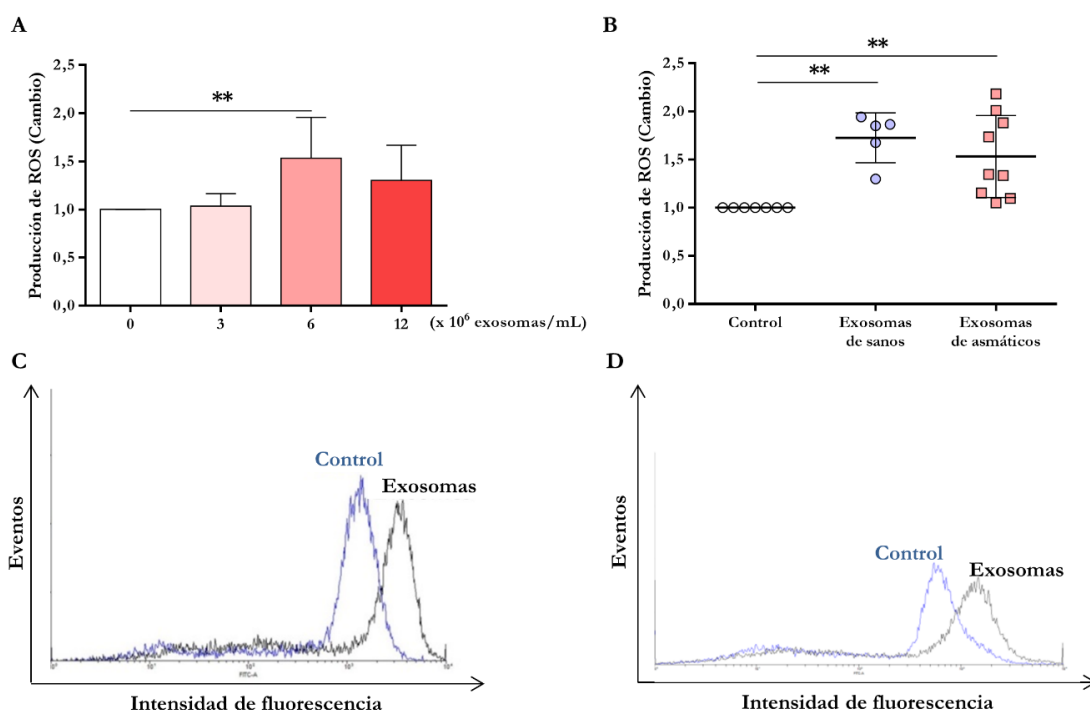


Figura 38. Producción de ROS por los eosinófilos de sujetos asmáticos. **A.** Curva dosis-respuesta de la producción de ROS por los eosinófilos en presencia de diferentes dosis de exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos. **B.** Se determinó el cambio en los niveles de ROS entre los eosinófilos incubados con medio ultracentrifugado (control) o con 6×10^6 exosomas/mL de individuos sanos o asmáticos. **C y D.** Histogramas representativos de citometría de flujo de la producción de ROS, en eosinófilos cultivados con exosomas de pacientes asmáticos (**C**) o de sujetos sanos (**D**). $**p < 0,01$.

En vista de los resultados, se puede afirmar que la presencia de exosomas de origen asmático aumenta significativamente la producción de NO y ROS, aunque esta última también es inducida por los exosomas de sujetos sanos.

4.3.4. Captación de los exosomas por los eosinófilos

El mecanismo de actuación de los exosomas en los eosinófilos planteó tres posibilidades: la primera es que los exosomas fueran internalizados por la célula y ejercieran sus efectos en el interior celular

Resultados

(a nivel citoplasmático o nuclear); la segunda es que se produjera la fusión de los mismos con la membrana plasmática liberando al interior celular su contenido o, la tercera, exclusivamente mediante la interacción con la superficie celular. Para resolver esta cuestión, los exosomas de sujetos asmáticos se marcaron (canal rojo) y se determinó su localización después de la captación por los eosinófilos (Fig. 39).

Tras realizar el experimento, se comprobó que los exosomas se localizaron en el interior del eosinófilo concentrándose en la región perinuclear, pero sin penetrar en el núcleo (Fig. 39B). La fluorescencia observada no se debe a uniones inespecíficas de los anticuerpos, como demuestran los controles realizados (Fig. 39A).

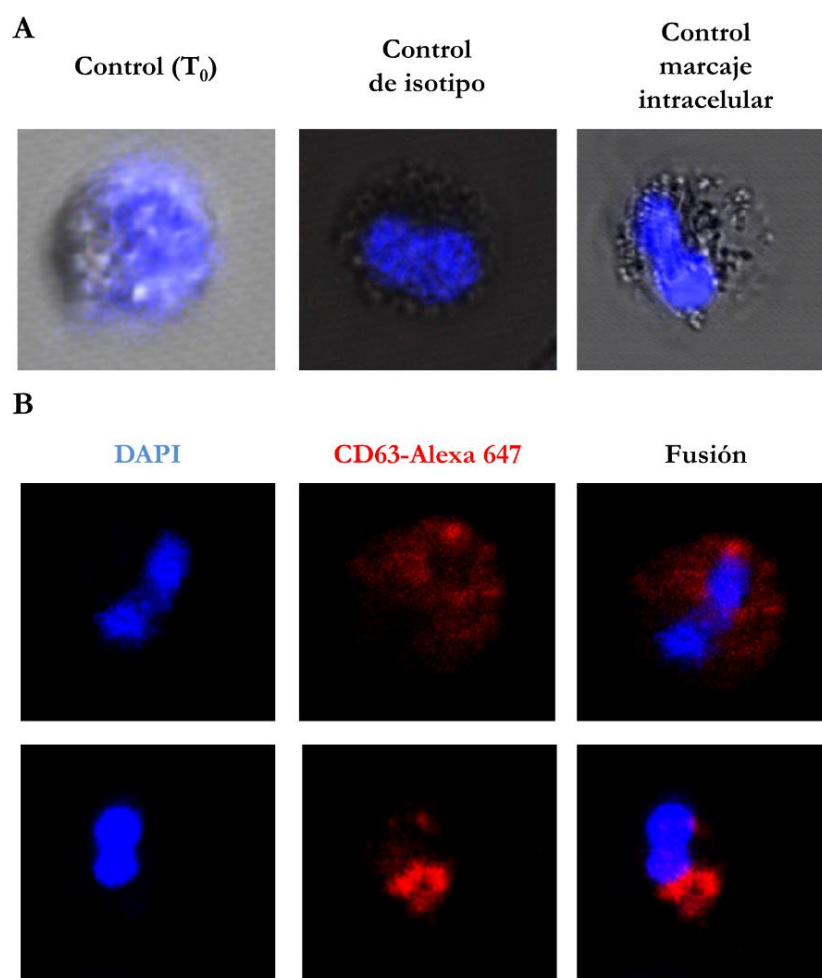


Figura 39. Internalización de los exosomas por los eosinófilos. **A.** Imágenes representativas del control de autofluorescencia (T₀), del control de unión inespecífica del anticuerpo secundario (control de isotipo) y del control de unión intracelular inespecífica a CD63 (control marcaje intracelular). **B.** Imágenes de la captación de exosomas marcados con CD63-Alexa 647 (canal rojo) por los eosinófilos de pacientes asmáticos a los 90 min.

Mediante estos experimentos se confirma que los exosomas eosinofílicos de origen asmático se internalizan al citoplasma, y así podrían ejercer su efecto alterando la funcionalidad normal del eosinófilo, aumentando su adhesión, su migración y la producción de moléculas pro-inflamatorias (NO y ROS). Sin embargo, no afectan sustancialmente a la apoptosis, lo que permitiría que se perpetuara la presencia de dichas células en el sitio de inflamación.

4.4. EFECTO DE LOS EXOSOMAS EN LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS ESTRUCTURALES DEL PULMÓN

A continuación, se describe el efecto que ejercen los exosomas procedentes de eosinófilos sobre otros dos tipos celulares importantes en el asma: las células epiteliales de vías respiratorias pequeñas y las células del músculo liso bronquial.

4.4.1. Ensayos funcionales en células epiteliales de vías respiratorias pequeñas (SAEC)

4.4.1.1. Apoptosis y daño epitelial

En el asma se produce una alteración y una descamación del epitelio pulmonar, generando un daño en dicho epitelio. Por esto, se planteó estudiar cómo influyen los exosomas en la apoptosis de estas células y en la reparación de la herida generada.

4.4.1.1.1. Papel de los exosomas en la apoptosis de las SAEC

Se determinó el porcentaje de apoptosis de las SAEC, mediante citometría de flujo, a diferentes tiempos (Fig. 40). A las 24 h se produjo un aumento en la apoptosis de las células incubadas con exosomas de pacientes asmáticos, tanto en relación a las células control ($21,80 \pm 9,07\%$ vs. $8,60 \pm 3,02\%$; $p < 0,01$, $n = 7$) como con respecto a las células cultivadas con exosomas de sujetos sanos ($21,80 \pm 9,07\%$ vs. $6,52 \pm 1,90\%$; $p < 0,001$, $n = 6$). A las 6 h y 48 h no se observó ningún cambio reseñable ($p > 0,05$).

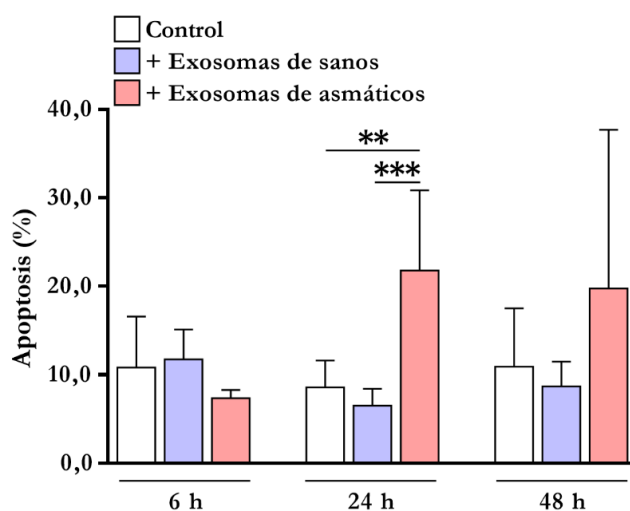


Figura 40. Apoptosis de células epiteliales de vías respiratorias pequeñas mediante citometría de flujo. Porcentaje de apoptosis en las SAEC tras el cultivo con el medio ultracentrifugado (control) o con 6×10^6 exosomas/mL de eosinófilos de pacientes asmáticos o de individuos sanos a diferentes tiempos. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

En todos los tiempos evaluados, los niveles de apoptosis de las células incubadas con exosomas de individuos sanos fueron similares a los obtenidos en el control sin exosomas ($p > 0,05$).

Resultados

Para ratificar estos resultados se utilizó la técnica de TUNEL (Fig. 41). En la evaluación de la apoptosis a las 24 h (Fig. 41B), se observa un aumento del porcentaje de células apoptóticas tras el cultivo con exosomas de pacientes asmáticos comparado con el control sin exosomas ($8,65 \pm 6,14\%$ *vs.* $1,33 \pm 0,55\%$; $p < 0,001$, $n = 25$) y con los exosomas de individuos sanos ($8,65 \pm 6,14\%$ *vs.* $2,47 \pm 1,12\%$; $p < 0,001$, $n = 22$). La Figura 41A muestra imágenes representativas de la apoptosis a las 24 h de todas las condiciones ensayadas.

Los exosomas de individuos sanos no tuvieron ningún efecto en la apoptosis de las SAEC ($p > 0,05$; Fig. 41B).

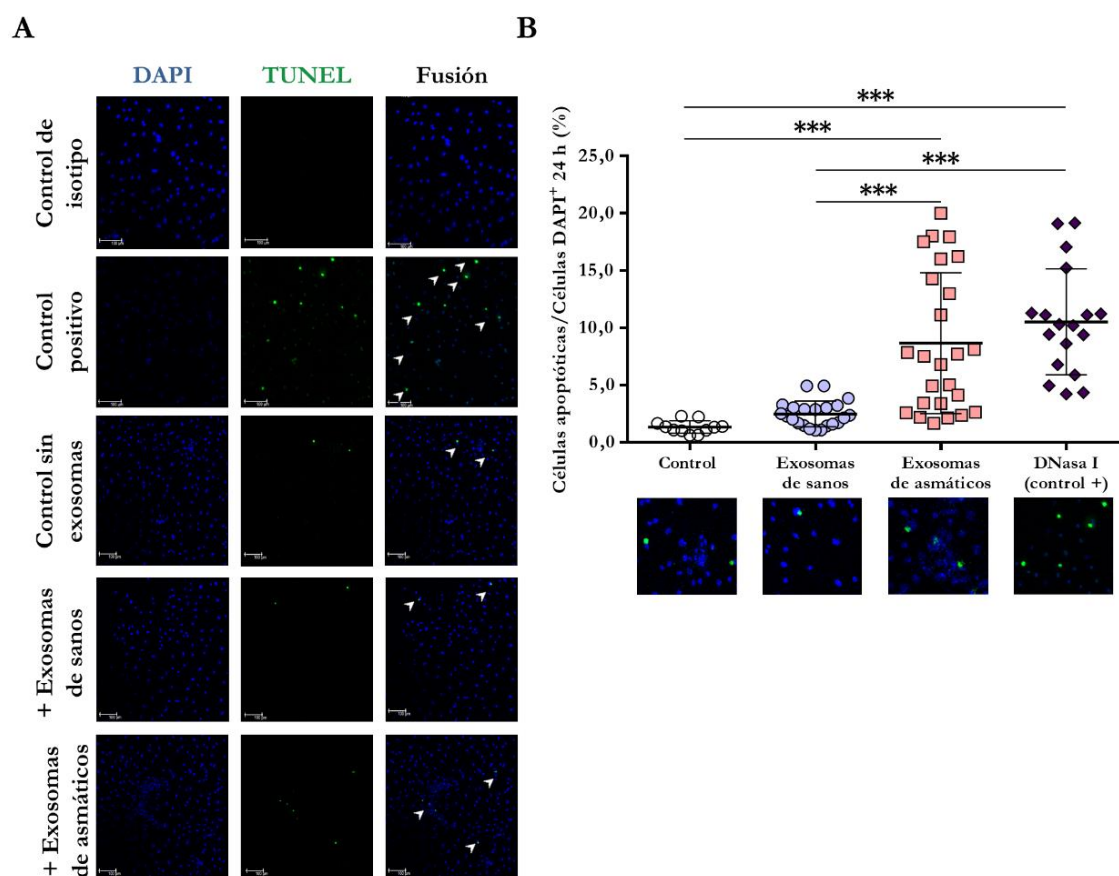


Figura 41. Apoptosis de las SAEC mediante TUNEL. A. Imágenes representativas de microscopía confocal a las 24 h de cultivo. Las células apoptóticas son las que tienen fluorescencia verde (indicadas por las puntas de flecha blancas). **B.** Porcentaje de células apoptóticas tras el cultivo durante 24 h con medio ultracentrifugado (control, $n = 11$), con 6×10^6 exosomas/mL de individuos sanos ($n = 22$) o de pacientes asmáticos ($n = 25$) o con DNasa I (control positivo, $n = 18$). *** $p < 0,001$.

4.4.1.1.2. Efecto de los exosomas en la reparación del daño epitelial

El proceso de reparación epitelial se evaluó en distintas condiciones: en presencia de exosomas de pacientes asmáticos ($n = 24$), de exosomas de individuos sanos ($n = 24$) o en ausencia de exosomas ($n = 24$), mediante ensayos de *time-lapse* (ensayos de cierre de herida).

En la Figura 42A se observa que los exosomas de pacientes con asma retrasan la reparación de la herida. Así, mientras que a las 12 h las células control han reparado más de la mitad de la herida ($55,15$

$\pm 25,21\%$), las células cultivadas con exosomas de sujetos asmáticos todavía no han llegado a ese porcentaje ($38,61 \pm 22,36\%$). Estas diferencias se acentúan más a las 24 h, cuando las células control han cerrado la herida completamente, mientras que las células con exosomas de individuos asmáticos solo han reparado el $76,67 \pm 23,25\%$ de la herida ($p < 0,05$; Fig. 42B).

Cuando las células se incubaron con exosomas de individuos sanos, se observó un comportamiento similar al de las células control, con un porcentaje de reparación de la herida del $53,77 \pm 18,80\%$ a las 12 h y del $99,60 \pm 11,67\%$ a las 24 h ($p > 0,05$; Fig. 42B).

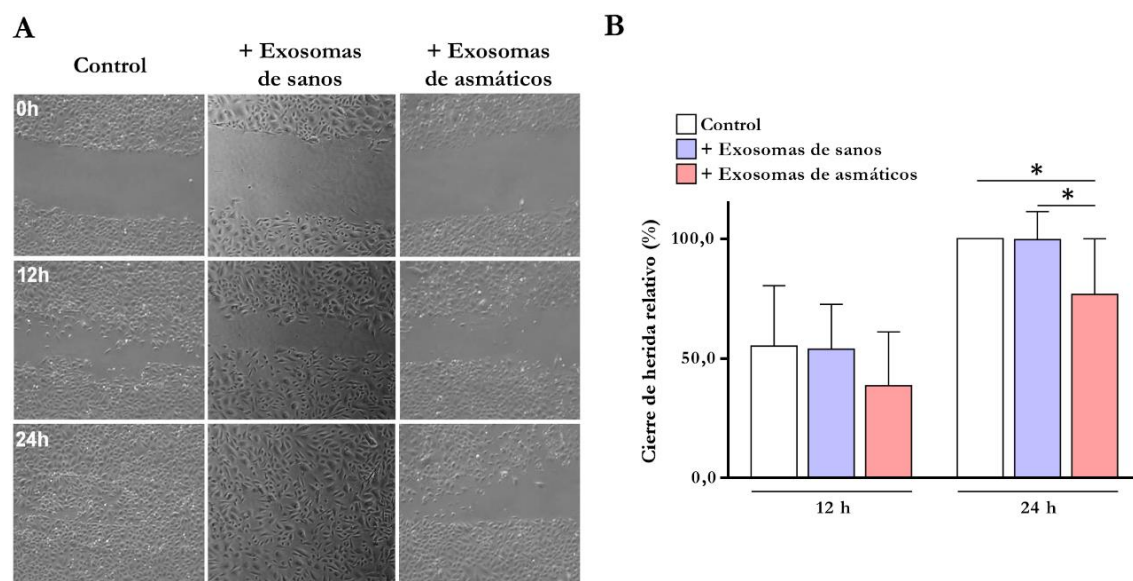


Figura 42. Reparación del daño epitelial establecido. **A.** Imágenes representativas de ensayos de cierre de herida donde se visualiza su evolución, a diferentes tiempos, en células cultivadas con medio ultracentrifugado (control) o con exosomas de eosinófilos de individuos sanos o de pacientes asmáticos (6×10^6 exosomas/mL). **B.** Cuantificación del cierre de herida en todas las condiciones y tiempos ensayados. El cierre relativo o reparación de herida se expresa como el porcentaje de área cubierta por las células en relación a la reparación completa de la herida a las 24 h. * $p < 0,05$.

Se puede concluir que los exosomas de los eosinófilos de pacientes asmáticos aumentan la apoptosis en las SAEC y retrasan la reparación de la herida generada, pudiendo dañar la barrera epitelial, lo que contribuiría al establecimiento de la enfermedad.

4.4.1.2. Expresión génica de diferentes factores pro-inflamatorios en las SAEC

Se decidió evaluar el patrón de expresión génica de diferentes mediadores pro-inflamatorios con un papel relevante en estos procesos. Los ensayos se realizaron con dos variantes: en monocapa de células intacta y en monocapa celular con herida, simulando los estadios tempranos y avanzados de la enfermedad, respectivamente.

4.4.1.2.1. Expresión génica en células epiteliales sin daño establecido

Como se aprecia en la Figura 43, en las SAEC incubadas con exosomas de pacientes asmáticos se encontró un aumento en la expresión génica de tres factores pro-inflamatorios, en comparación con

Resultados

las células cultivadas con exosomas de individuos sanos y a las células control: *TNF* a las 24 h ($p < 0,05$, $n = 5$), y *CCL26* y *POSTN* a las 6 h ($p < 0,05$, $n = 5$).

En cambio, la expresión génica de dichos factores de las células incubadas con exosomas de sujetos sanos tuvo un comportamiento similar al de las células control ($p > 0,05$, $n = 5$).

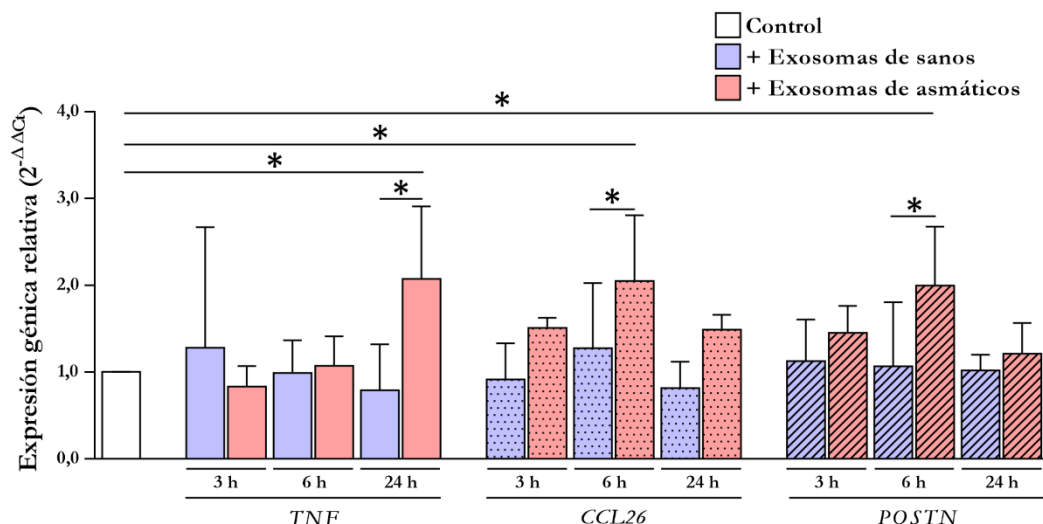


Figura 43. Expresión génica relativa de *TNF*, *CCL26* y *POSTN* en las células epiteliales sin daño previo establecido. Se determinaron los niveles génicos relativos de *TNF*, *CCL26* y *POSTN* a diferentes tiempos por RT-qPCR en las SAEC incubadas con medio ultracentrifugado (control) o con 6×10^6 exosomas/mL de sujetos sanos o asmáticos. * $p < 0,05$.

En los demás genes evaluados, a los mismos tiempos y en células cultivadas con exosomas de pacientes asmáticos, no se encontraron cambios en la expresión génica ($p > 0,05$, $n = 5$; Fig. 44).

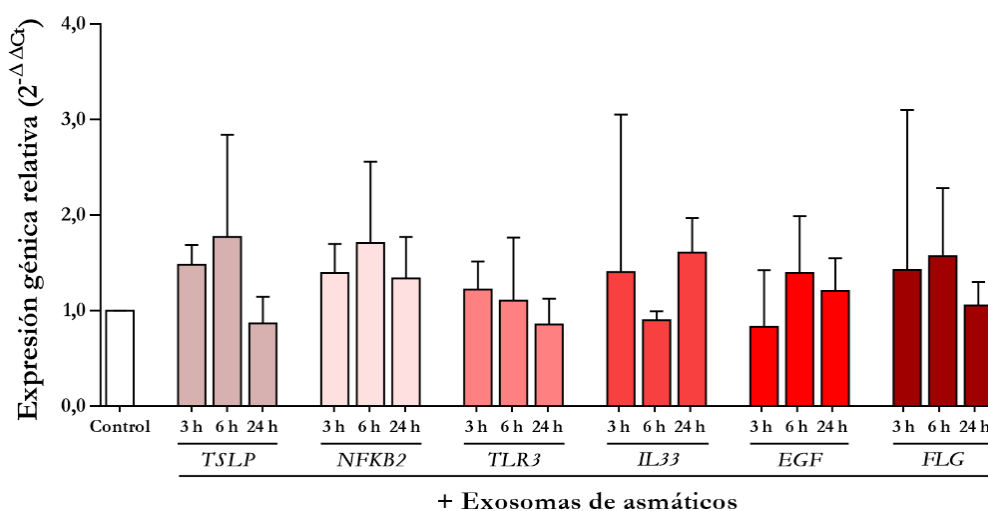


Figura 44. Expresión génica relativa de factores pro-inflamatorios en las células epiteliales sin daño previo establecido. La expresión génica relativa se cuantificó mediante RT-qPCR en las SAEC cultivadas con 6×10^6 exosomas/mL de pacientes asmáticos a diferentes tiempos.

4.4.1.2.2. Expresión génica en células epiteliales con daño establecido

En los ensayos de expresión génica en las SAEC con daño previamente establecido (Fig. 45), se observa un aumento en la expresión de los mismos genes descritos en el apartado anterior en presencia de exosomas de pacientes asmáticos, con respecto a las células cultivadas con exosomas de

individuos sanos y a las células control, aunque dicho aumento ocurrió a diferentes tiempos: *TNF* a las 3 h ($p < 0,05$, $n = 5$), y *CCL26* y *POSTN* a las 24 h ($p < 0,05$, $n = 5$).

Cuando las células se incubaron con exosomas de sujetos sanos los niveles de expresión génica fueron similares a los del control ($p > 0,05$, $n = 5$; Fig. 45).

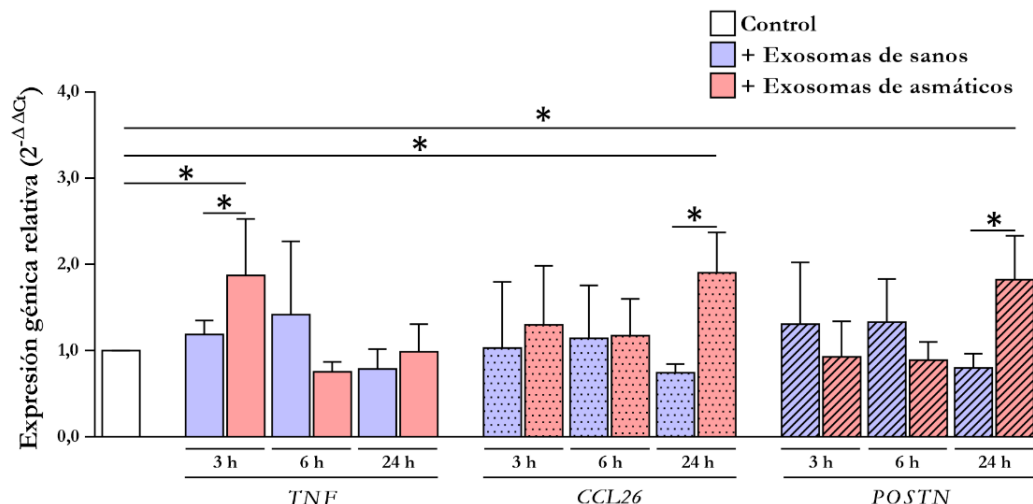


Figura 45. Expresión génica relativa de *TNF*, *CCL26* y *POSTN* en las células epiteliales con daño establecido. Se determinaron los niveles génicos relativos de *TNF*, *CCL26* y *POSTN* a diferentes tiempos mediante RT-qPCR en las SAEC incubadas con medio ultracentrifugado (control) o con 6×10^6 exosomas/mL de sujetos sanos o de pacientes asmáticos. * $p < 0,05$.

En el resto de genes evaluados, tras la incubación de las SAEC con exosomas de pacientes asmáticos, no se encontraron cambios con respecto al control sin exosomas ($p > 0,05$; $n = 5$; Fig. 46).

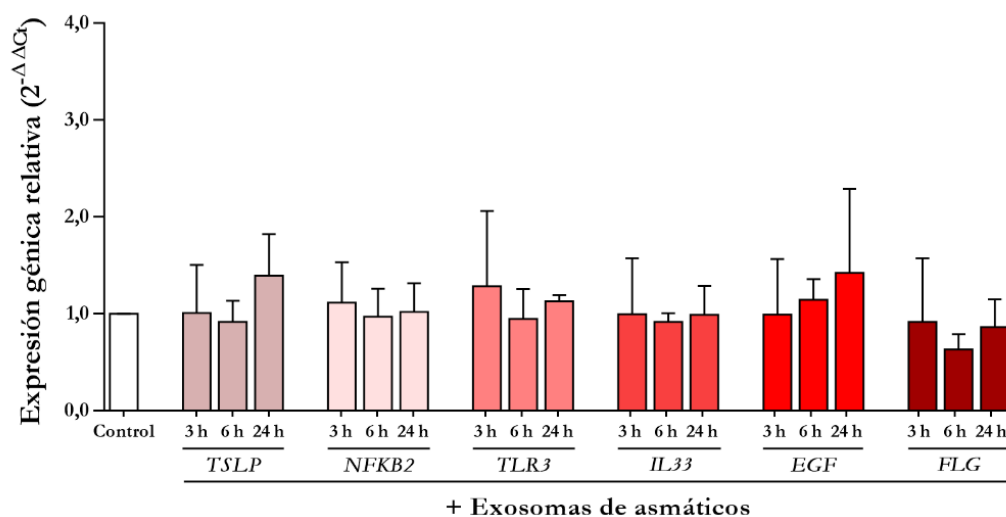


Figura 46. Expresión génica relativa de diferentes factores pro-inflamatorios en las células epiteliales con daño establecido. La expresión génica relativa se cuantificó mediante RT-qPCR en las SAEC cultivadas con 6×10^6 exosomas/mL de pacientes asmáticos a diferentes tiempos.

4.4.1.3. Evaluación de las vías de señalización PI3K/AKT y JAK/STAT

Debido a su implicación en la patología asmática, se estudió el estado de fosforilación de la proteína quinasa B fosforilada (pAKT) y del factor transductor de la señal y activador de la transcripción fosforilado (pSTAT3), componentes de las vías de transducción de señales de fosfatidilinositol 3

Resultados

quinasa/proteína quinasa B (PI3K/AKT) y Janus/factor transductor de la señal y activador de la transcripción (JAK/STAT).

Como se observa en la Figura 47, la incubación de las SAEC con exosomas de pacientes asmáticos modifica la fosforilación de los dos factores estudiados. A las 24 h, se produjo una disminución en los niveles de fosforilación de ambos factores en comparación con las células control y con las células cultivadas con exosomas de sujetos sanos: pAKT ($0,56 \pm 0,15$ veces; $p < 0,001$ y $p < 0,01$, $n = 6$) y pSTAT3 ($0,81 \pm 0,20$ veces; $p < 0,01$, $n = 6$). Sin embargo, a las 48 h la situación se revirtió, observando un aumento en la fosforilación de ambos factores en relación al control ($1,25 \pm 0,05$ y $1,22 \pm 0,20$ veces; $p < 0,01$ y $p < 0,05$, $n = 6$; respectivamente).

En las SAEC incubadas con exosomas de individuos sanos no se modificó el estado de fosforilación de pAKT ni de pSTAT3 a ninguno de los tiempos evaluados ($p > 0,05$, $n = 6$).

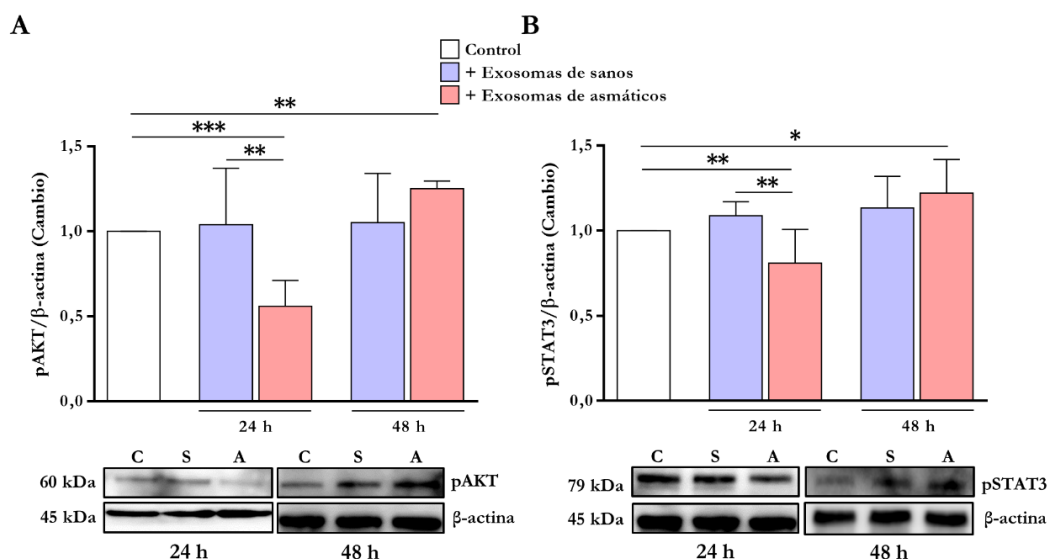


Figura 47. Estado de fosforilación de AKT y STAT3 en las SAEC. A. Cuantificación por densitometría de la expresión proteica de pAKT (A) y pSTAT3 (B) a las 24 h y 48 h, con o sin 6×10^6 exosomas/mL de eosinófilos de ambos orígenes. C: control (células incubadas con medio ultracentrifugado); S: células incubadas con exosomas de individuos sanos; A: células incubadas con exosomas de pacientes asmáticos. La expresión de la β-actina se utilizó para normalizar los niveles de expresión proteicos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.4.1.4. Captación de los exosomas por las SAEC

En la Figura 48A se observan imágenes representativas de la captación de exosomas por parte de las SAEC correspondientes a las distintas condiciones de trabajo utilizadas. Los exosomas (puntos verdes fluorescentes) penetran en el interior celular, sin entrar dentro del núcleo, localizándose en la región perinuclear.

También se observan diferencias en la intensidad de fluorescencia entre las diferentes condiciones ensayadas, siendo dicha fluorescencia mayor en las células incubadas con exosomas de pacientes asmáticos en comparación con las SAEC cultivadas con los exosomas de sujetos sanos ($6,48 \pm 3,75$ vs. $3,27 \pm 1,08$ unidades arbitrarias; $p < 0,05$, $n = 8$; Fig. 48B), lo que implica una mayor captación de estos exosomas.

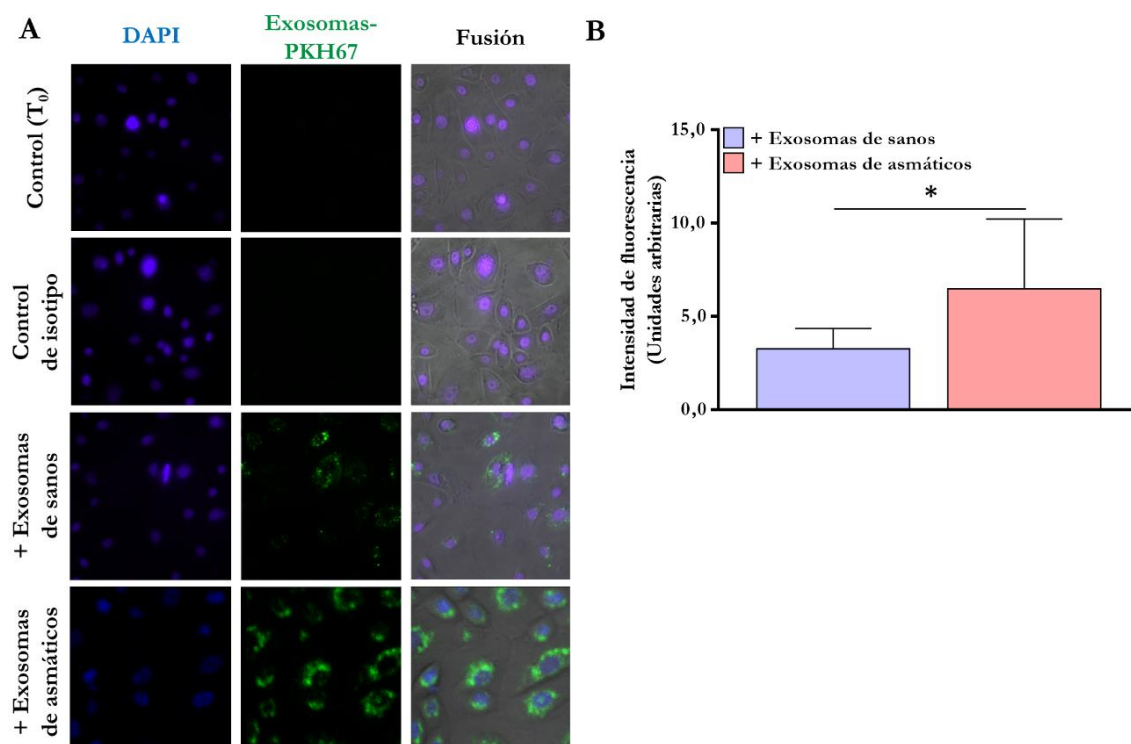


Figura 48. Captación de los exosomas por las SAEC. **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal de la internalización de los exosomas marcados (verde) a los 60 min de cultivo. **B.** Cuantificación de la fluorescencia producida por la captación de los exosomas marcados con PKH67. * $p < 0,05$.

Todos estos resultados demuestran que los exosomas eosinofílicos de pacientes asmáticos son internalizados por las células produciendo un aumento de la apoptosis, un retraso de la reparación del daño epitelial, una alteración de la expresión génica de *TNF*, *CCL26* y *POSTN*, así como una modificación del estado de fosforilación de AKT y STAT3.

4.4.2. Ensayos funcionales en células del músculo liso bronquial (BSMC)

Se determinó el efecto que ejercen los exosomas de eosinófilos en los procesos característicos de otro tipo celular implicado en el asma: las células de la musculatura lisa bronquial.

4.4.2.1. Evaluación de la proliferación de las células del músculo liso bronquial

Dada la importancia y repercusión que tiene la hiperplasia muscular pulmonar en la clínica del asma, se estudió la proliferación de las BSMC en ausencia o en presencia de exosomas procedentes de eosinófilos de ambas poblaciones de estudio.

En la Figura 49 se observa que, a las 72 h, se produce un aumento de la proliferación de las BSMC cultivadas con exosomas de pacientes asmáticos respecto al control sin exosomas ($1,24 \pm 0,10$ veces; $p < 0,001$, $n = 7$) y a las células incubadas con exosomas de sujetos sanos ($p < 0,01$, $n = 8$). A tiempos más cortos (24 h y 48 h) no existieron cambios en la proliferación ($0,87 \pm 0,13$ y $0,91 \pm 0,05$ veces, respectivamente; $p > 0,05$, $n = 7$).

Resultados

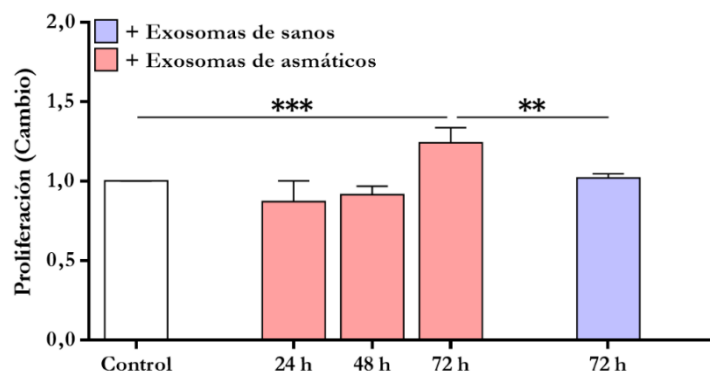


Figura 49. Proliferación de las células del músculo liso bronquial. Se determinó la proliferación de las BSMC cultivadas con medio ultracentrifugado (control), o con 6×10^6 exosomas/mL de sujetos sanos o de pacientes asmáticos a distintos tiempos. $**p < 0,01$, $***p < 0,001$.

Tras el cultivo de las células con exosomas de individuos sanos, se observó que la proliferación era similar a la observada en el control ($1,02 \pm 0,03$ veces, $p > 0,05$, $n = 8$; Fig. 49).

4.4.2.2. Evaluación de la vía de señalización MAPK/ERK

Las vías de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) se han vinculado con los procesos de proliferación en este tipo celular. Por esta razón, se estudió la implicación de estas vías de señalización en los cambios observados en la proliferación.

Mediante *western blot*, se evaluaron los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) en las BSMC a las 72 h. Como se observa en la Figura 50, los niveles proteicos de pERK1/2 estaban aumentados a las 72 h tras la incubación con exosomas de pacientes asmáticos respecto a las células control ($1,19 \pm 0,14$ veces; $p < 0,001$, $n = 11$). Sin embargo, los exosomas de individuos sanos no ejercieron ningún efecto reseñable ($0,87 \pm 0,32$ veces; $p > 0,05$, $n = 7$).

Al incubar las células con el PD98059 antes de añadir los exosomas de individuos asmáticos, los niveles de pERK1/2 fueron similares a los obtenidos en el control sin exosomas ($0,97 \pm 0,29$ veces; $p > 0,05$, $n = 6$).

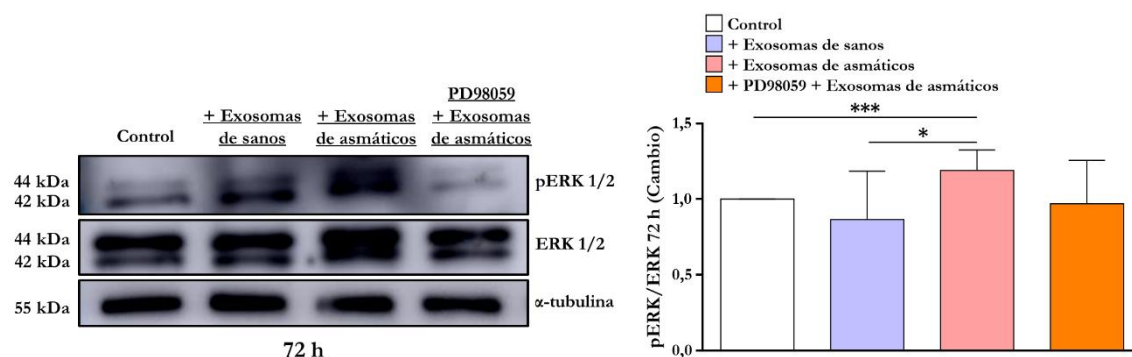


Figura 50. Estado de fosforilación de ERK1/2 en BSMC. *Western blot* y cuantificación de los niveles de pERK1/2 tras la incubación durante 72 h con 6×10^6 exosomas/mL de eosinófilos de sujetos sanos o asmáticos o sin exosomas (control). Los niveles proteicos de pERK1/2 también fueron evaluados tras el tratamiento con el inhibidor PD98059 antes de añadir los exosomas. La expresión de la ERK1/2 se utilizó para normalizar los niveles de expresión proteicos. La α -tubulina se utilizó como control de carga. $*p < 0,05$, $***p < 0,001$.

Mediante experimentos similares se estudió la implicación de las vías ERK1/2 en la proliferación de las BSMC, inhibiendo su fosforilación y evaluando los cambios en el proceso de proliferación.

Como se observa en la Figura 51, cuando las células se trataron con el inhibidor PD98059 y se incubaron, posteriormente, con exosomas de pacientes asmáticos, se produjo una disminución significativa de la proliferación en relación a las células cultivadas con exosomas de sujetos asmáticos sin el inhibidor ($1,03 \pm 0,05$ vs. $1,24 \pm 0,10$ veces; $n = 9$, $p < 0,0001$).

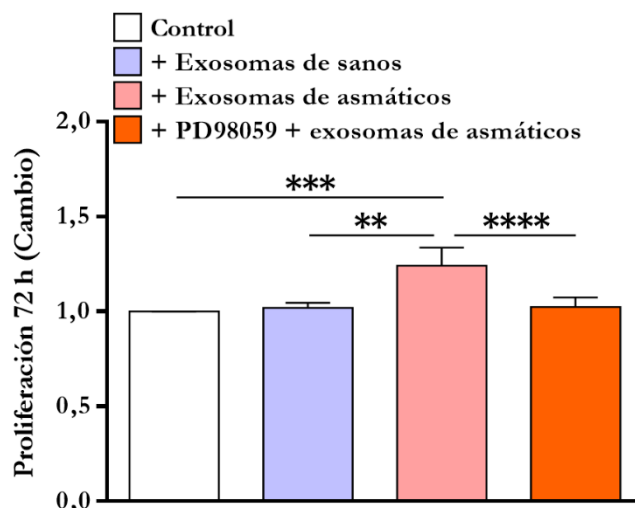


Figura 51. Proliferación de las BSMC. Se determinó la proliferación a las 72 h después del cultivo de las BSMC sin exosomas (control), con 6×10^6 exosomas/mL de sujetos sanos o asmáticos, o tras la inhibición de la fosforilación de ERK1/2. $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

4.4.2.3. Expresión génica de factores angiogénicos y fibróticos en las BSMC

Tras añadir exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos y de individuos sanos a las células, se evaluó la expresión génica de diferentes moléculas importantes en los procesos asmáticos: *CCR3*, *VEGFA*, *TGFB1*, *MMP9*, *TNF* y *FGF2*.

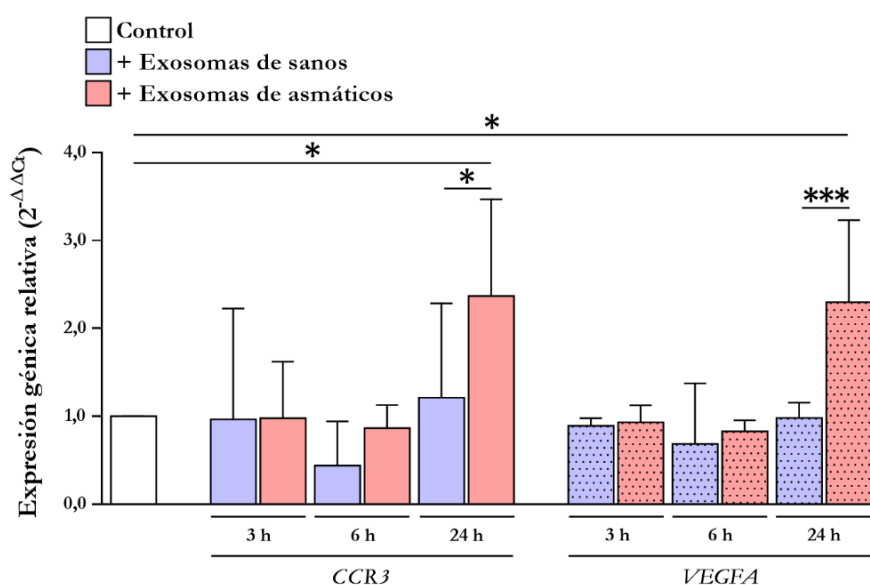


Figura 52. Expresión génica relativa de *CCR3* y *VEGFA* en BSMC. Se determinó la expresión génica mediante RT-qPCR a diferentes tiempos tras el cultivo de las células con medio ultracentrifugado (control) o 6×10^6 exosomas/mL de origen sano o asmático. $*p < 0,05$, $***p < 0,001$.

Resultados

Como se observa en la Figura 52, existe un aumento en la expresión génica de dos de los factores evaluados, a las 24 h, en células incubadas con exosomas eosinofílicos de pacientes asmáticos en comparación con las células cultivadas con medio ultracentrifugado (control) y con las células cultivadas en presencia de exosomas de individuos sanos: *CCR3* ($2,37 \pm 1,10$ veces; $p < 0,05$, $n = 6$) y *VEGFA* ($2,30 \pm 0,93$ veces; $p < 0,05$ y $p < 0,01$, $n = 6$).

En cambio, cuando se añadieron exosomas procedentes de eosinófilos de sujetos sanos, no se observó cambio en la expresión de estos dos genes, en ninguno de los tiempos evaluados ($p > 0,05$, $n = 6$; Fig. 52).

Los demás genes analizados no sufrieron variaciones en su expresión en ninguna de las condiciones ensayadas ($p > 0,05$, $n = 5$; Fig. 53).

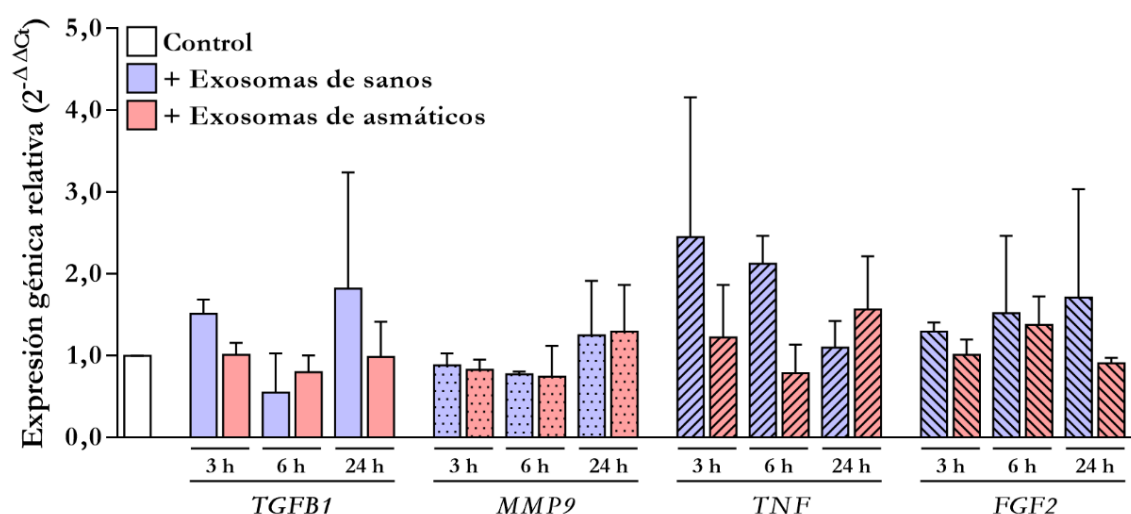


Figura 53. Expresión génica de factores fibróticos y pro-inflamatorios. Niveles génicos relativos, determinados mediante RT-qPCR, tras la incubación de las BSMC con medio ultracentrifugado (control) o 6×10^6 exosomas/mL de sujetos sanos o asmáticos durante distintos tiempos.

4.4.2.4. Captación de los exosomas por las BSMC

Se examinó si los exosomas eran capaces de penetrar en el interior de las BSMC o, por el contrario, ejercían sus efectos por contacto con las proteínas de la membrana plasmática.

En la Figura 54A se observan imágenes representativas de todas las condiciones experimentales utilizadas, donde se aprecia que los exosomas se internalizan y se concentran en la región perinuclear, sin llegar a penetrar en el núcleo.

También se constató que las BSMC incubadas con exosomas de pacientes asmáticos tuvieron una mayor intensidad de fluorescencia comparadas con las células cultivadas con exosomas de sujetos sanos ($3,52 \pm 2,58$ vs. $1,36 \pm 1,05$; $p < 0,05$, $n = 8$; Fig. 54B), lo que indica una mayor internalización de este tipo de exosomas.

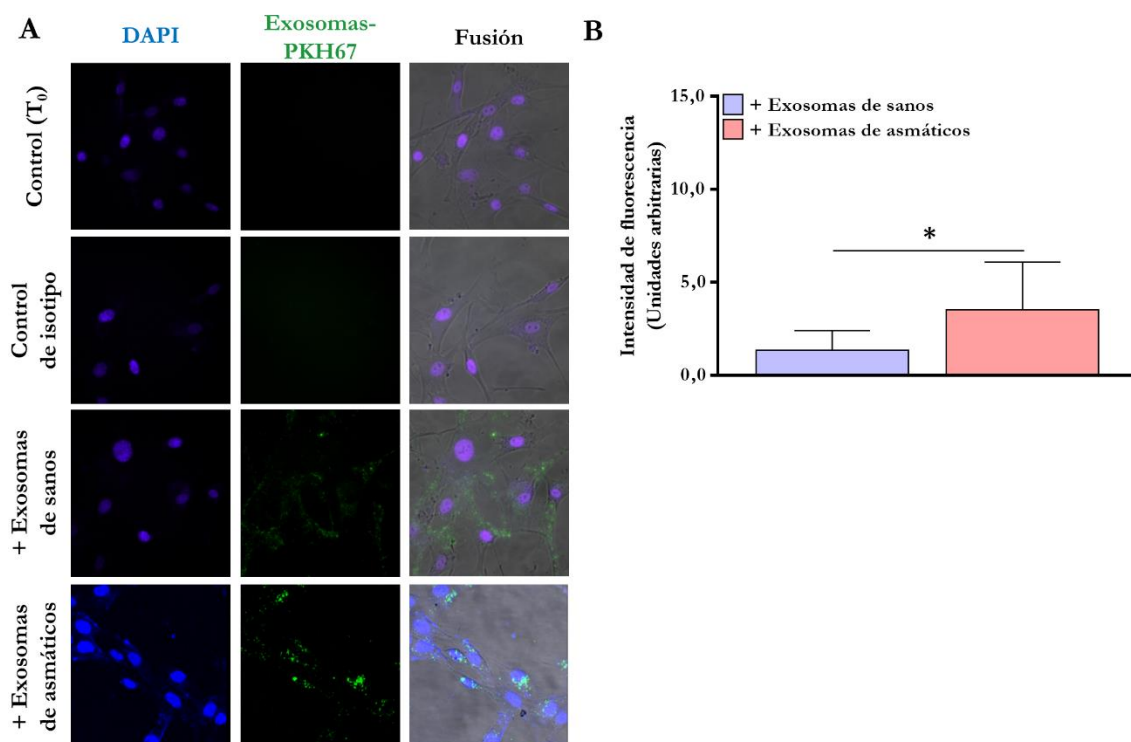


Figura 54. Captación de los exosomas por las BSMC. **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal de la internalización de los exosomas marcados (verde) a los 45 min de cultivo. **B.** Cuantificación de la fluorescencia producida por la captación de los exosomas marcados con PKH67. $*p < 0,05$.

En resumen, se ha confirmado que los exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos son capaces de penetrar en el interior de las BSMC, aumentando su proliferación mediante la activación de la vía de las ERK1/2. También, se produce una alteración en el perfil de expresión génica de *CCR3* y *VEGFA*, pudiendo favorecer con todo esto la sintomatología asociada a la enfermedad.

4.5. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE MICROARN DE EOSINÓFILOS Y DE SUS EXOSOMAS

En los últimos años, el estudio de los miARN ha aumentado de manera exponencial. Su fácil obtención, localización en diversos fluidos biológicos, resistencia a la degradación y versatilidad les confiere unas propiedades que les hace ser unos excelentes biomarcadores. Por todo esto, se decidió estudiar los miARN de los eosinófilos y de sus exosomas, analizando la expresión diferencial existente entre pacientes asmáticos e individuos sanos.

4.5.1. MiARN de eosinófilos

4.5.1.1. Estudio por secuenciación de nueva generación de la expresión de los miARN de eosinófilos

Para realizar este estudio, se secuenciaron 4 muestras de ARN enriquecidas en miARN procedentes de eosinófilos de individuos sanos y 6 de eosinófilos de pacientes asmáticos.

Resultados

Inicialmente se encontraron 539 miARN, de los cuales 24 estaban diferencialmente expresados entre los eosinófilos de ambos grupos (p y FDR < 0,05; Tabla 7). De estos miARN, 14 estaban sobre-expresados en pacientes asmáticos y 10 sub-expresados.

AUMENTADOS		DISMINUIDOS	
miARN	INV	miARN	INV
hsa-miR-1-3p	10,7	hsa-miR-590-3p	-1,17
hsa-miR-1246	9,27	hsa-miR-1260b	-1,21
hsa-miR-1290	7,21	hsa-miR-1260a	-1,22
hsa-miR-4425	2,36	hsa-miR-7977	-1,33
hsa-miR-4521	2,29	hsa-miR-4443	-2,51
hsa-miR-146b-3p	1,81	hsa-miR-486-5p	-2,78
hsa-miR-320b	1,56	hsa-miR-5100	-3,04
hsa-miR-146a-5p	1,3	hsa-miR-451a	-3,4
hsa-miR-320a	1,24	hsa-miR-144-5p	-3,6
hsa-miR-146b-5p	1,2	hsa-miR-144-3p	-5,22
hsa-miR-185-5p	1,11		
hsa-miR-664a-5p	1,09		
hsa-miR-21-5p	0,95		
hsa-miR-629-5p	0,92		

Tabla 7. MiARN diferencialmente expresados entre eosinófilos de sujetos sanos y de pacientes asmáticos. Estos 24 miARN tienen un FDR y un valor p inferior a 0,05. Los marcados en verde son aquellos que se encuentran aumentados en la condición de asma. Los marcados en rojo son los que están disminuidos en la población asmática en relación al grupo de los sujetos sanos. INV, inducción expresada en número de veces.

4.5.1.2. Validación de los miARN con expresión diferencial

Para la validación de los resultados de los miARN identificados mediante secuenciación masiva, se utilizó la RT-qPCR con una población de estudio diferente a la utilizada previamente, compuesta por muestras de eosinófilos de 10 individuos sanos y de 29 pacientes asmáticos.

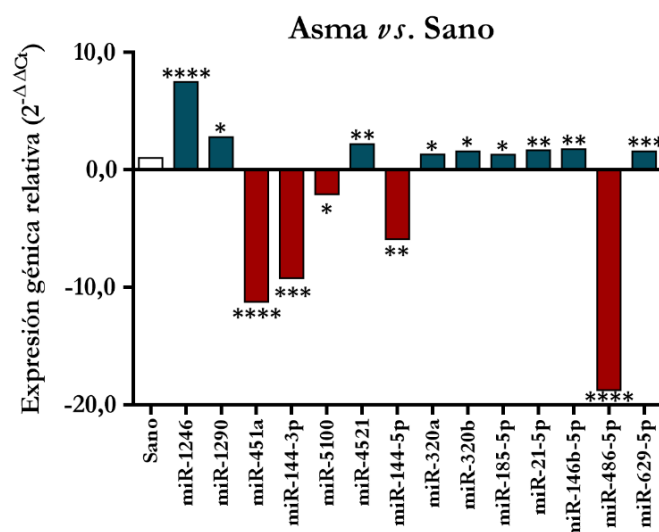


Figura 55. Expresión génica relativa de los miARN diferencialmente expresados entre eosinófilos de sujetos sanos y asmáticos. Validación mediante RT-qPCR de miARN de eosinófilos identificados en la secuenciación masiva. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Mediante RT-qPCR, de los 24 miARN analizados, se confirmó la existencia de 14 miARN diferencialmente expresados entre eosinófilos de sujetos sanos y asmáticos, como se observa en la Figura 55. De estos 14 miARN, 9 de ellos se encontraron sobre-expresados en eosinófilos de pacientes asmáticos y los otros 5 disminuidos.

Los 10 miARN restantes (miR-1-3p, miR-4425, miR-146b-3p, miR-146a-5p, miR-664a-5p, miR-7977, miR-4443, miR-590-3p, miR-1260a y miR-1260b) no mostraron cambios en su expresión ($p > 0,05$), descartándolos del estudio.

Se escogió el hsa-miR-103a-3p para realizar la normalización de los datos, ya que tenía una expresión más estable en todas las muestras evaluadas (Ct en eosinófilos de individuos sanos = $21,51 \pm 0,53$, $n = 7$; Ct en eosinófilos de pacientes asmáticos = $21,98 \pm 0,64$; $n = 15$, $p > 0,05$).

4.5.1.3. Análisis de *clusters* de los miARN diferencialmente expresados en eosinófilos

Los datos de expresión de los miARN, obtenidos por RT-qPCR, se utilizaron para construir agrupamientos o *clusters* que permiten diferenciar y clasificar a los diferentes sujetos de un estudio.

4.5.1.3.1. Análisis de componentes principales (PCA) y agrupamiento de las muestras de miARN de origen eosinofílico

El agrupamiento de las muestras se realizó con la herramienta bioinformática *ClustVis*, la cual utiliza la técnica estadística del PCA y permite construir *heatmaps* a partir de los datos de expresión de los miARN.

Como se observa en la Figura 56A, el PCA de los 14 miARN eosinofílicos diferencialmente expresados permite diferenciar dos grupos: grupo sano (S) y grupo asmático (A). Con dicho agrupamiento se pudo explicar el 59,30% de la varianza total encontrada.

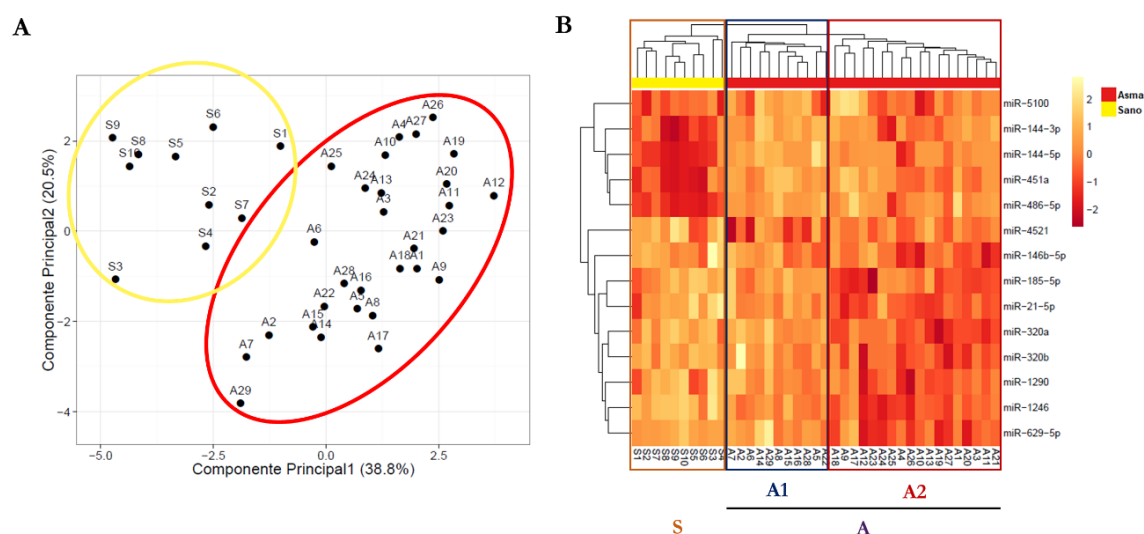


Figura 56. Análisis de grupos en función de los 14 miARN diferencialmente expresados en eosinófilos. **A.** Análisis de componentes principales donde se visualiza un agrupamiento de las muestras que coincide con su estatus sano (amarillo) o asmático (rojo). **B.** El *heatmap* establece una clasificación de los sujetos del estudio.

Resultados

En el *heatmap* también se observa que las muestras quedaron agrupadas en los dos grupos de estudio (Fig. 56B). Además, con este análisis se identificó que dentro del grupo de los asmáticos existen 2 subgrupos diferenciados (A1 y A2).

4.5.1.3.2. Comparaciones de los miARN entre los diferentes grupos establecidos

La subclasificación del grupo asmático en dos grupos: A1 ($n = 11$) y A2 ($n = 18$) podría estar relacionada con las características clínicas y/o epidemiológicas de los pacientes. Por ello, se estudiaron las diferencias de expresión de los miARN entre los grupos y su relación con otros biomarcadores y datos clínicos.

Al comparar la expresión de los 14 miARN entre los tres *clusters* formados, se identificó que todos ellos se encontraban diferencialmente expresados entre los grupos A2 y S. Comparando los grupos A1 y S, se observaron 7 miARN cuya expresión estaba alterada (miR-1246, miR-451a, miR-144-3p, miR-5100, miR-4521, miR-144-5p y miR-486-5p). El análisis entre los grupos A2 y A1 determinó que existían 8 miARN expresados de manera diferencial (miR-1246, miR-1290, miR-144-5p, miR-320a, miR-320b, miR-185-5p, miR-21-5p y miR-629-5p). Todas estas comparaciones están reflejadas en la Tabla 8.

miARN	Clusters		
	A1 vs. S	A2 vs. S	A2 vs. A1
miR-1246	3,71 (**)	11,51 (***)	3,10 (**)
miR-1290	1,31 (NS)	4,45 (*)	3,40 (*)
miR-451a	-16,94 (***)	-8,73 (***)	1,94 (NS)
miR-144-3p	-18,27 (***)	-6,08 (***)	3,01 (NS)
miR-5100	-2,49 (*)	-2,55 (*)	-1,02 (NS)
miR-4521	2,86 (**)	1,96 (*)	-1,46 (NS)
miR-144-5p	-9,84 (***)	-4,35 (**)	2,26 (*)
miR-320a	1,01 (NS)	1,55 (***)	1,53 (***)
miR-320b	1,10 (NS)	1,94 (***)	1,76 (**)
miR-185-5p	1,03 (NS)	1,46 (***)	1,41 (***)
miR-21-5p	1,23 (NS)	2,01 (***)	1,63 (**)
miR-146b-5p	1,36 (NS)	2,05 (**)	1,50 (NS)
miR-486-5p	-24,13 (***)	-16,12 (***)	1,50 (NS)
miR-629-5p	1,04 (NS)	2,01 (***)	1,94 (**)

Tabla 8. Comparación de la expresión de los 14 miARN entre los diferentes grupos establecidos. A1, subgrupo Asma 1; A2, subgrupo Asma 2; S, grupo Sano; NS, no significativo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Cuando se evaluó la eosinofilia en los distintos *clusters*, se observó que era mayor en el subgrupo A2 en comparación al A1 ($5,80 \pm 1,77\%$ vs. $3,17 \pm 1,52\%$, $p < 0,01$; Fig. 57A)

Como se observa en la Figura 57B, al comparar los niveles de periostina en plasma entre los tres

clusters, se determinó que la concentración de periostina era superior en el subgrupo A2 en comparación al grupo sano ($26,96 \pm 16,33$ vs. $12,23 \pm 8,87$ ng/mL; $p < 0,05$) y al subgrupo A1 ($26,96 \pm 16,33$ vs. $11,92 \pm 5,27$ ng/mL; $p < 0,05$).

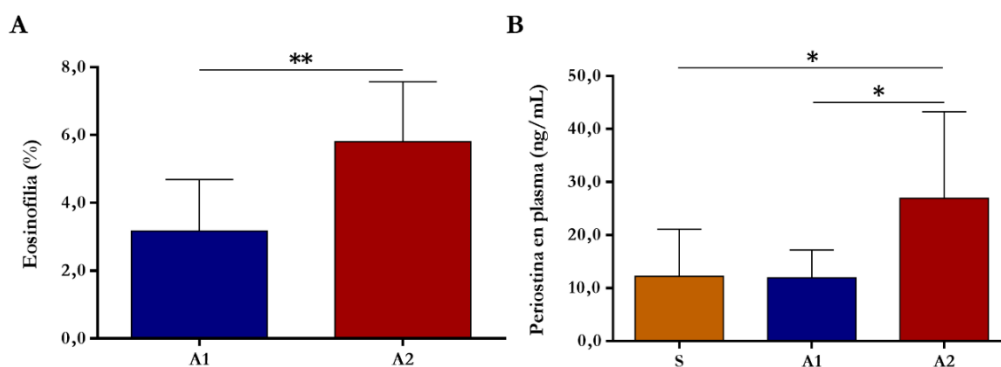


Figura 57. Parámetros clínicos de los sujetos de estudio pertenecientes a los diferentes *clusters*.
A. Porcentaje de eosinófilos en sangre periférica de los dos subgrupos de pacientes asmáticos: A1 y A2.
B. Cuantificación mediante ELISA de los niveles plasmáticos de periostina de los tres *clusters*: S, A1 y A2.
 $*p < 0,05$, $**p < 0,01$.

La expresión de estos miARN se podría relacionar con la eosinofilia y los niveles de periostina en plasma.

4.5.2. MiARN de exosomas de eosinófilos

Los exosomas constituyen el principal mecanismo de transferencia de los miARN. Por esta razón se planteó estudiar si los 14 miARN expresados diferencialmente entre eosinófilos de origen sano y asmático, estaban presentes en sus exosomas.

4.5.2.1. Estudio de miARN en exosomas procedentes de eosinófilos

Para realizar estos experimentos se utilizaron 18 muestras de exosomas que derivan de eosinófilos de individuos asmáticos y 6 de exosomas eosinofílicos de sujetos sanos.

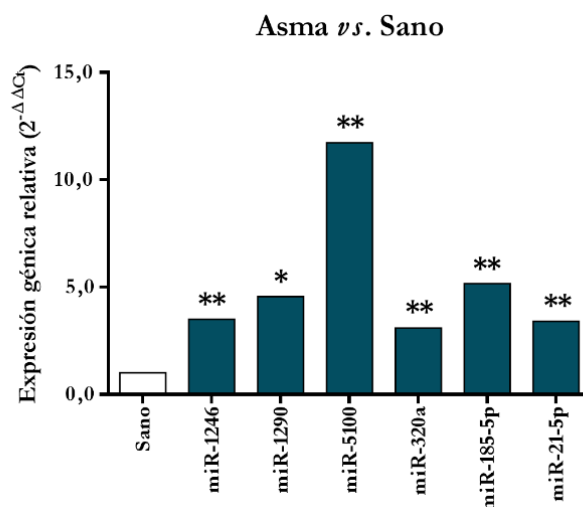


Figura 58. Expresión génica relativa de los miARN exosomales procedentes de eosinófilos de individuos sanos y de pacientes asmáticos. Determinación de los niveles de expresión génica de varios miARN en exosomas. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$.

Resultados

Mediante RT-qPCR, se identificaron 6 miARN cuya expresión estaba aumentada en los exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos, al menos, más de 4 veces con respecto a los niveles de expresión en exosomas de sujetos sanos ($p < 0,05$ y $p < 0,01$; Fig. 58). La expresión del resto de los miARN no fue detectable por esta técnica.

En este caso, se demostró que el RNU6 era el miARN endógeno más recomendable, ya que tenía mayor estabilidad y homogeneidad entre las muestras evaluadas de una población previa (Ct en exosomas de eosinófilos de sujetos sanos = $28,19 \pm 1,25$, $n = 6$; Ct en exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos = $28,66 \pm 1,25$; $n = 11$, $p > 0,05$).

4.5.2.2. Análisis de componentes principales y agrupamiento de las muestras de miARN exosomales

En la Figura 59A se visualizan 2 grupos: sano (amarillo) y asma (rojo) y, gracias al PCA, se pudo explicar el 82,60% de la varianza total encontrada en las muestras.

En el *heatmap* se determina que todas las muestras se clasifican dentro de su grupo correspondiente (Fig. 59B), aunque en el PCA se observa que las muestras S1 y A7 se localizan en una intersección de las dos condiciones.

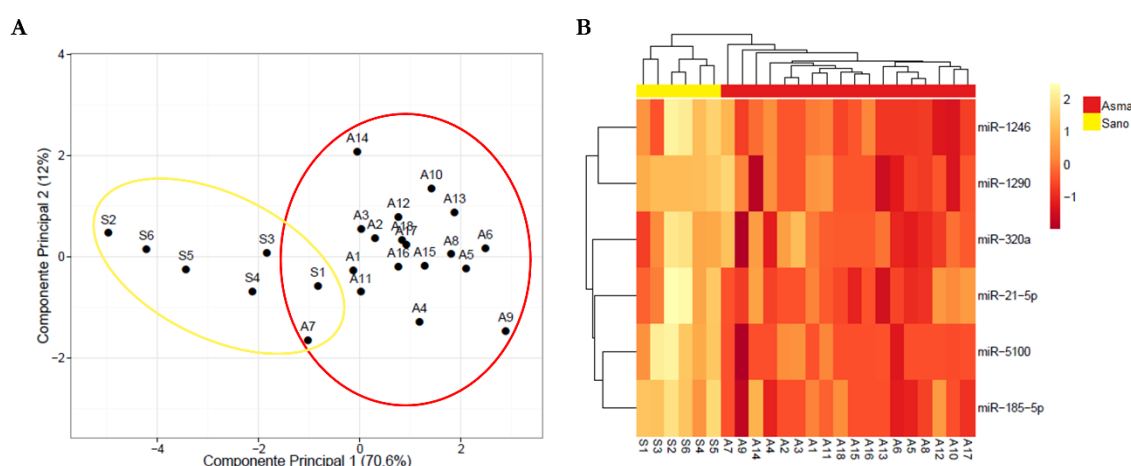
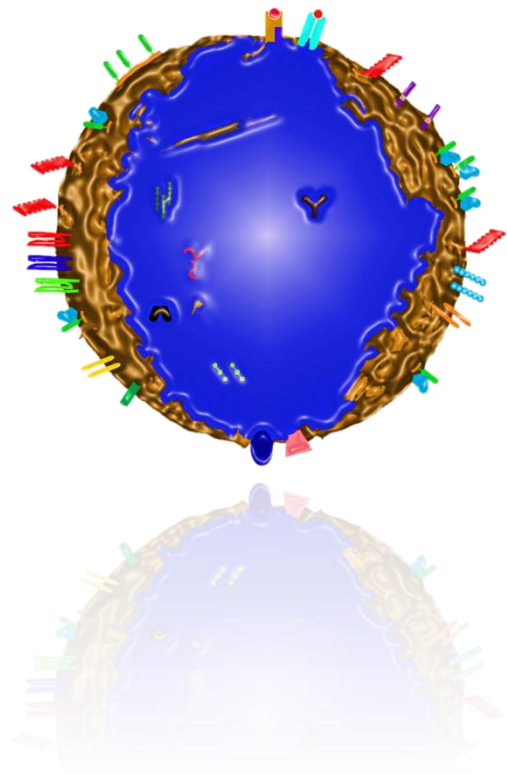


Figura 59. Agrupamiento de los sujetos del estudio en función de los miARN exosomales diferencialmente expresados. A. El PCA se realizó con los datos de la expresión de los miARN diferenciales de exosomas procedentes de los sujetos sanos y asmáticos. **B.** *Heatmap* de la expresión de los miARN diferencialmente expresados en exosomas de eosinófilos.

En resumen, se ha establecido un perfil diferencial de miARN entre eosinófilos de sujetos sanos y asmáticos, estando alguno de estos miARN diferencialmente expresados en los exosomas secretados por estas células. Estos perfiles de miARN eosinofílicos y exosomales permiten clasificar a los sujetos de estudio según su estatus patológico.



5. DISCUSIÓN

El asma es una enfermedad del sistema respiratorio de carácter complejo y multifactorial, siendo la variabilidad una de sus señas de identidad más importantes [4]. Aunque en las últimas décadas ha habido un gran avance en el conocimiento del asma y de su tratamiento, aún se desconocen bastantes aspectos, haciendo que no sea sencilla su clasificación y el diagnóstico de los pacientes en los múltiples fenotipos y sub-fenotipos establecidos [157].

Dentro de los fenotipos asmáticos el más común es el de tipo Th2, que se caracteriza por tener usualmente una etiología alérgica y la presencia de eosinófilos en el infiltrado celular inflamatorio pulmonar, que desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de esta patología [158]. Analizando los datos epidemiológicos de los sujetos utilizados en el presente estudio, el porcentaje de IgE sérica total de los pacientes asmáticos es elevado, reflejando el perfil inmune de tipo Th2 de esta enfermedad y su asociación con el aumento de eosinófilos en sangre [159].

En la presente tesis se ha estudiado el papel que juegan estas células en el asma desde el punto de vista de la interacción con los componentes del entorno inflamatorio en el que se encuentran. Esto se ha realizado siguiendo una serie de fases bien establecidas:

1. Búsqueda, identificación y caracterización de exosomas liberados por los eosinófilos de individuos sanos y de pacientes asmáticos.
2. Estudio del efecto que producen dichos exosomas sobre los propios eosinófilos, una de las principales células efectoras del asma.
3. Efecto e interacción de estos exosomas con parte de los componentes celulares de la estructura pulmonar: células epiteliales de vías respiratorias pequeñas y células del músculo liso bronquial.
4. Identificación de un perfil diferencial de miARN de eosinófilos entre sujetos sanos e individuos asmáticos.

5.1. BÚSQUEDA, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS LIBERADOS POR LOS EOSINÓFILOS

En la presente tesis se describe por primera vez la presencia de cuerpos multivesiculares en eosinófilos y la capacidad de estas células de secretar exosomas al medio extracelular. Hasta el momento, se había objetivado el hecho de que muchas células del sistema inmune como los linfocitos B, células dendríticas, linfocitos T, mastocitos y macrófagos son capaces de secretar exosomas [105,160-163], pero nunca antes se había descrito en los eosinófilos. La biología única del eosinófilo está definida por sus numerosos gránulos en su citoplasma, los cuales contienen proteínas catiónicas que causan daño tisular [164], así como elementos pro-inflamatorios (citocinas, mediadores lipídicos, quimiocinas) que intervienen activamente en la patología asmática [60,165]. La demostración de que el eosinófilo tiene cuerpos multivesiculares ha sido un paso fundamental para el estudio de la producción de exosomas por parte de estas células.

Discusión

Inicialmente, se confirmó la presencia de MVB mediante el marcaje del LBPA por microscopía confocal y microscopía electrónica (Fig. 14 y 15). La importancia de esta molécula radica en que proporciona una curvatura negativa a la membrana de los MVB durante su invaginación y, como consecuencia, se forman las vesículas intraluminales [166]. Además, se constató la presencia de CD63 en los MVB mediante microscopía confocal (Fig. 14). Esta tetraspanina es abundante en ciertos gránulos, principalmente en endosomas tardíos y en MVB, y aparece en la membrana plasmática como consecuencia de la fusión de los MVB con esta [167,168]. La expresión molecular del binomio CD63⁺/LBPA⁺ indica que los gránulos que lo poseen son MVB maduros que, al fusionarse con la membrana plasmática, liberan los exosomas al medio extracelular [88].

En términos generales, la liberación de los exosomas por las células es controlada por un mecanismo de secreción selectiva de los gránulos preformados en respuesta a diferentes estímulos como el IFN- γ [169-172], que se desencadena por un incremento en la concentración de calcio intracelular seguido por una activación de la PKC [173-176]. Concretamente, en el caso de los eosinófilos, el IFN- γ actúa como estimulante óptimo de la movilización de MVB y de la secreción de los exosomas [177] ya que regula e induce de manera específica la secreción de vesículas primarias, aunque no es un inductor de la formación *de novo* de MVB (Fig. 16, 17 y 18). En el presente trabajo se ha comprobado que la PKC juega un papel importante en la regulación de la secreción de exosomas por los eosinófilos, hasta tal punto que su inhibición provoca una disminución de dicha secreción (Fig. 21). Previamente, se ha descrito el papel que desempeña la PKC en el mecanismo de liberación de exosomas por parte de los linfocitos T [178], aunque nunca antes se había descrito en eosinófilos.

Confirmada la existencia de MVB en los eosinófilos, el siguiente objetivo fue determinar la liberación activa de exosomas y su caracterización mediante diferentes aproximaciones experimentales.

En primer lugar, se evaluó la presencia de algunas de las principales moléculas que caracterizan a los exosomas como CD63, CD9 y ALIX, las cuales se encuentran entre las 25 proteínas más identificadas en exosomas [179] y que habitualmente son utilizadas como marcadores proteicos de los mismos [180]. Estas proteínas se seleccionaron en base a su relación con las vías de la biogénesis de exosomas y de MVB [181]. La presencia de estas proteínas en los exosomas liberados al medio por parte de los eosinófilos se pudo demostrar en los ensayos de identificación de proteínas por *western blot* (Fig. 19 y 20). La expresión de estas moléculas aumentó cuando las células se estimularon con IFN- γ , indicando que este estímulo es un potente secretagogo, como previamente se ha comentado. A diferencia del IFN- γ , se ha demostrado que la eotaxina-1 no estimula la secreción de exosomas, aunque es un excelente quimioatrayente para los eosinófilos humanos y se ha considerado un estímulo relevante en el asma y en las respuestas inmunes tipo Th2 [182].

El siguiente paso en la caracterización consistió en determinar el tamaño y la morfología de los exosomas mediante dos técnicas diferentes: microscopía electrónica de transmisión y análisis de nanopartículas utilizando el *Nanosight LM10*.

El tamaño de los exosomas de eosinófilos, obtenido por medio del *Nanosight LM10*, fue de $176,85 \pm 22,54$ nm de diámetro en el caso de los exosomas de pacientes asmáticos y $175,33 \pm 5,03$ nm en el caso de los exosomas de sujetos sanos (Fig. 23). Estas medidas se corresponden con el rango de tamaño aceptable para los exosomas analizados por medio de esta técnica [183]. Mediante este equipo, también se describió que los eosinófilos procedentes de pacientes asmáticos eran capaces de liberar una mayor cantidad de exosomas que los eosinófilos de individuos sanos (Fig. 24). Esta diferencia en la cantidad de exosomas liberados podría atribuirse a la sobre-estimulación que los eosinófilos de pacientes asmáticos experimentan durante el desarrollo de la enfermedad, así como al estado de activación de los mismos [184].

Cuando se analizaron los exosomas por microscopía electrónica de transmisión, estos exhibían un diámetro aparentemente menor. La diferencia de tamaño se debe a dos aspectos fundamentales: primero, a la menor sensibilidad del equipo *Nanosight LM10* y, segundo, a los artefactos de contracción durante la fijación de las muestras utilizadas en la microscopía electrónica, que pueden generar un tamaño aparentemente inferior de las nanovesículas [185]. En concordancia con nuestros resultados, otros investigadores han observado estas mismas diferencias de tamaño en las vesículas procedentes de la misma muestra, dependiendo del método de análisis [186]. Sin tener en cuenta la discrepancia de tamaños, la caracterización inequívoca de los exosomas se realizó por medio de microscopía electrónica de transmisión (Fig. 22). Mediante esta técnica se confirmó la estructura morfológica y molecular típica del exosoma, con la doble membrana lipídica característica de estas nanovesículas y con inmunorreactividad positiva para ALIX y CD63 [187].

Continuando con el estudio de la caracterización de los exosomas, se analizó el perfil proteico exosomal de sujetos sanos y de asmáticos mediante *western blot* y espectrometría de masas (Fig. 25 y 26; Tabla 9, Anexo I). Dentro de las proteínas identificadas, aunque existían proteínas exclusivas de exosomas de individuos sanos y de pacientes asmáticos, la mayoría se encontraron presentes en ambos tipos, entre las que se encontraron las proteínas clásicas del eosinófilo: ECP, EPO, MBP y EDN, las cuales también están presentes en los gránulos primarios y se ha descrito su papel fundamental en el asma [68]. También se identificaron otras proteínas importantes en la patogénesis del asma, como la periostina, y otras relacionadas con diferentes procesos celulares como la migración, la adhesión, la señalización celular, el estrés oxidativo y la inflamación, entre otros. Algunas de las proteínas descritas en estos exosomas se han identificado previamente en el proteoma completo del eosinófilo [155], confirmando el origen eosinofílico de los exosomas.

Sorprendentemente, mediante espectrometría de masas no se identificaron los marcadores de exosomas que se habían determinado previamente por *western blot* (ALIX, CD63 y CD9), aunque sí se describieron otras proteínas características de exosomas, como las proteínas de choque térmico y las proteínas Rab. Probablemente, esto sea debido a que la espectrometría de masas es una técnica menos sensible que el *western blot*, ya que identifica péptidos específicos entre una ingente población de péptidos y los que están en una baja proporción podrían pasar desapercibidos en la identificación;

mientras que, mediante *western blot*, se busca una molécula específica y se amplifica la señal para poder detectarla. Respecto al contenido proteico, a nivel cualitativo, se ha observado que ambos tipos de exosomas son bastante similares y, aunque el análisis proteico exhibió pequeñas diferencias en su composición, estas fueron sutiles. Por lo tanto, la única diferencia objetiva existente entre ambas poblaciones, hasta este punto del estudio, es que los eosinófilos de pacientes asmáticos liberan mayor cantidad de exosomas que los eosinófilos de sujetos sanos.

Una de las características más importantes del asma Th2 o eosinofílico son los niveles incrementados de eosinófilos y de sus proteínas granulares, que están implicadas en los episodios de exacerbación del asma [53]. Las evidencias de que los exosomas de eosinófilos son funcionales, ya que contienen proteínas relevantes en el asma y la secreción es mayor en eosinófilos de pacientes asmáticos, indicaría que estos exosomas podrían estar desempeñando un papel esencial en esta enfermedad.

5.2. ESTUDIO DEL EFECTO AUTOCRINO QUE EJERCEN LOS EXOSOMAS SOBRE LAS PRINCIPALES CÉLULAS EFECTORAS DEL ASMA: LOS EOSINÓFILOS

Actualmente, no existen estudios de los efectos que tienen los exosomas de eosinófilos en diferentes enfermedades, y en concreto en el asma, ya que esta es la primera vez que se define su existencia y se caracterizan sus propiedades.

Recientemente, varias publicaciones han hecho hincapié en la relación que existe entre los exosomas y diferentes enfermedades alérgicas, como el asma [104,106,188,189], estableciéndose una asociación entre exosoma y enfermedad. En este contexto, también se han descrito algunos de los efectos que tienen los exosomas de diferentes tipos celulares en diversas patologías, incluida el asma [104,190,191]. Sin embargo, el origen de los exosomas no ha sido examinado en cada patología de manera individual, lo que impide evaluar el efecto particular que tiene cada subpoblación de exosomas sobre la patogenia. Por ello, el siguiente paso fue demostrar los efectos que ejercen los exosomas de origen eosinofílico sobre los propios eosinófilos.

Los eosinófilos son granulocitos polimorfonucleares que desempeñan un papel crucial en enfermedades de distinta índole, como son las infestaciones parasitarias por helmintos y el asma. Mientras que en la infestación helmíntica el eosinófilo desempeña un papel protector, en el contexto de la patología asmática el eosinófilo contribuye al establecimiento y desarrollo de la enfermedad a través de diferentes mecanismos, por ejemplo mediante la liberación de citocinas Th2, incluida la IL-5 [192], quimiocinas, leucotrienos, así como las proteínas básicas citotóxicas (MBP, EDN, EPO y ECP) [193]. La liberación de todos estos mediadores promueve y contribuye a la inflamación, a la hiperreactividad y remodelado de las vías respiratorias, a la hipersecreción de moco y al daño tisular [184].

En el presente estudio se ha descrito que los exosomas de eosinófilos contienen un número relevante de proteínas, entre las que se encuentran importantes componentes funcionales de estas células (Fig. 25; Tabla 9, Anexo I). Por lo tanto, es probable que la liberación de exosomas contribuya al desarrollo de las características del asma, actuando directamente sobre las células y alterando diferentes funciones celulares, no solo en células adyacentes, sino también en estructuras celulares de ubicación más alejada. Por esta razón, era imprescindible conocer si los efectos de los exosomas procedentes de eosinófilos de pacientes asmáticos eran similares a los de exosomas procedentes de eosinófilos de sujetos sanos o, por el contrario, dependían del estado patológico del individuo.

A pesar de que los eosinófilos poseen una vida media limitada en condiciones normales, la acción de varias citocinas como IL-3, IL-5, IL-13 y GM-CSF [194], producidas de manera autocrina o por otros tipos celulares, incrementan la supervivencia del eosinófilo en la sangre periférica y en el pulmón, disminuyendo su muerte por apoptosis [195] y favoreciendo la eosinofilia característica del asma. En el presente estudio, se ha constatado un menor porcentaje de apoptosis en los eosinófilos de origen asmático en comparación con los eosinófilos de sujetos sanos, tanto en presencia como en ausencia de exosomas (Fig. 27). Gracias a esta menor tasa de muerte celular y a que la presencia de exosomas en el medio no modificó de manera reseñable la apoptosis, los eosinófilos permanecerían más tiempo en sangre periférica y/o en el foco inflamatorio, pudiendo perpetuar el daño. Todos estos hallazgos concuerdan con investigaciones realizadas previamente, donde se ha demostrado que los eosinófilos de pacientes asmáticos tienen una tasa de apoptosis menor que la de los eosinófilos de individuos sanos, favorecido principalmente por la presencia de las citocinas anti-apoptóticas [194].

En el desplazamiento de los eosinófilos desde el torrente circulatorio hacia los tejidos, estas células reciben señales específicas para poder acceder a la zona de inflamación, debiendo atravesar el endotelio. La adhesión y la migración son procesos cuidadosamente regulados por la acción de varias citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión [196]. Los eosinófilos expresan en su superficie celular un conjunto de moléculas de adhesión que les permite interactuar con las células del endotelio, posibilitando así su anclaje y extravasación hacia el foco inflamatorio. La presencia de los exosomas de origen asmático incrementó la expresión de dichas proteínas transmembrana de adhesión (integrinas) en la superficie del eosinófilo, aumentando con ello su capacidad de adhesión (Fig. 29).

Las integrinas son proteínas transmembranales heterodiméricas cuya función principal es la mediación de la interacción y adhesión entre las células y la matriz extracelular. A través de sus regiones citoplasmáticas, las integrinas se asocian con múltiples proteínas como son las encargadas de reorganizar el citoesqueleto y otras responsables de producir una señalización intracelular adecuada, modulando el crecimiento celular y la apoptosis [197,198]. En el presente estudio se ha descrito el aumento de la expresión en la superficie de los eosinófilos de alguna de estas integrinas en presencia de los exosomas de pacientes asmáticos (Fig. 34), concretamente ICAM-1 y la subunidad α_2 que forma parte del dímero $\alpha_2\beta_1$ (VLA-2), la cual tiene capacidad de unión al colágeno de tipo I y III. A pesar de que ICAM-1 no se encuentra muy expresada en la superficie de los eosinófilos, cuando

Discusión

estos interactúan con ciertos mediadores solubles como TNF- α , IFN- γ e IL-3, su expresión se ve aumentada de manera considerable [199]. También se ha comprobado que las integrinas $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$ están vinculadas con procesos implicados en el desarrollo de la adhesión de los eosinófilos y la trans migración de estos desde los vasos sanguíneos hacia las vías respiratorias [200]. Todas estas proteínas juegan un papel fundamental a la hora de direccionar a los eosinófilos hacia los sitios donde la inflamación tiene lugar, siendo este foco inflamatorio, en el caso del asma, el pulmón [201-204].

Probablemente, otra de las funciones que podrían tener estas integrinas es la de interaccionar con los exosomas mediante otras proteínas de superficie presentes en estas nanovesículas, de tal manera que facilitaría la captura y entrada de los exosomas hacia el interior celular donde ejercerían sus funciones. En este estudio se ha demostrado que los exosomas son captados por los eosinófilos e internalizados hacia el citoplasma (Fig. 39), del mismo modo que ha sido descrito en otros tipos celulares [205-207]. Probablemente esto ocurra mediante la interacción entre integrinas, aunque para corroborarlo sería necesario realizar más estudios.

La migración es otro proceso fundamental, e íntimamente asociado a la adhesión, que permite la llegada de los eosinófilos al foco inflamatorio desde el torrente circulatorio. Dicha migración se produce gracias a la acción de varias señales quimiotácticas y de diferentes citocinas, siendo las principales responsables de la acumulación de los eosinófilos en los pulmones [208,209].

Los exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos mostraron la capacidad de incrementar la migración de los eosinófilos (Fig. 31), actuando como estímulos quimiotácticos y no como agentes quimio cinéticos (Fig. 33), ya que provocaron un movimiento dirigido de estas células. Varios estudios han demostrado que los exosomas de varios tipos celulares poseen propiedades quimiotácticas [162], comportándose de igual manera que los exosomas descritos en el presente trabajo. Aunque en la composición proteica de los exosomas no se observaron las quimiocinas “clásicas” del eosinófilo (RANTES, CCL11, CCL26), sí se encontraron otras proteínas que han sido descritas como quimioatrayentes como son: S100-A8, S100-A9, EDN, la anafilatoxina C3a y otras moléculas del metabolismo de las prostaglandinas y leucotrienos [210-212]. Aunque estas proteínas se encuentran presentes en los exosomas de ambos orígenes, se demostró que los exosomas de individuos sanos no impulsan la migración dirigida de los eosinófilos. A nivel cualitativo la composición proteica de ambos tipos de exosomas era muy similar; por tanto, los efectos quimiotácticos observados en los exosomas de pacientes asmáticos podrían estar causados por la mayor cantidad de alguna de estas proteínas en este tipo de exosomas, aunque los mecanismos que subyacen a esta migración no están del todo claros.

Asociado a este proceso migratorio se observó que los eosinófilos migrados debido al efecto quimiotáctico que ejercen los exosomas, tenían una mayor expresión del receptor de quimiocinas CCR3 (Fig. 35). Este receptor es capaz de orquestar la actividad de las eotaxinas e inducir señales intracelulares que desencadenan diversos procesos, como la activación del flujo de calcio y la

polimerización de actina, favoreciendo de esta manera la migración [213-215]. Al no haber identificado en los exosomas los ligandos conocidos de este receptor, probablemente algunas de las proteínas contenidas en estas nanovesículas podrían estar actuando como ligando de CCR3, favoreciendo su expresión y, en última instancia, la migración.

Una vez que las células han migrado al foco inflamatorio, es allí donde producen la liberación de ciertos mediadores pro-inflamatorios, entre los que se encuentran diferentes citocinas, NO y ROS, aumentando con ello el estrés oxidativo de la célula. A bajos niveles de estrés oxidativo, los antioxidantes pueden restaurar la homeostasis redox celular; sin embargo, cuando los niveles de estímulos oxidativos aumentan, se activan una serie de mecanismos y señalizaciones intracelulares que desencadenan los procesos inflamatorios [216]. Dentro de las ROS se encuentran diferentes compuestos como el anión superóxido (O_2^-) [216], el cual puede reaccionar con el NO para formar el peroxinitrito ($ONOO^-$) siendo un potente agente oxidativo que daña la estructura de las proteínas, alterando su función y agravando los procesos inflamatorios [217,218]. Por esta razón, el NO y las ROS son mediadores importantes en la patogénesis del asma, existiendo un desequilibrio entre la síntesis y degradación de estas ROS, lo cual ejerce un efecto perjudicial sobre las células y tejidos de las vías respiratorias [219].

En el presente estudio, se ha demostrado que el aumento de la liberación de ROS y NO que ocurre en los eosinófilos se produce como consecuencia de la presencia de los exosomas de pacientes asmáticos, existiendo un mecanismo de regulación autocrina positiva (Fig. 36 y 38). Esto puede generar un agravamiento de la inflamación, induciendo daño en el epitelio respiratorio y promoviendo la exacerbación del asma. La producción de ROS es un proceso que ocurre en múltiples tipos celulares (neutrófilos, monocitos, macrófagos y células estructurales del pulmón, como las células epiteliales y las células del músculo liso bronquial [219-221]), entre los que se encuentran los eosinófilos, ya que poseen la maquinaria enzimática necesaria para producir estas ROS y el NO, como son la EPO y la óxido nítrico sintetasa (NOS).

En este proceso de liberación de ROS, los exosomas de sujetos sanos también incrementaron la producción de ROS en los eosinófilos (Fig. 38). Probablemente, este efecto sea debido a que dicha producción sea una respuesta inespecífica frente a cualquier agente extraño, como es la presencia de estos exosomas en el medio, activando ciertas vías de señalización que estarían desencadenando la generación de estos agentes oxidantes. Otra posible explicación se sustenta en la presencia de diferentes enzimas contenidas en los exosomas y relacionadas con el estrés oxidativo como la catalasa o la peroxidasa del eosinófilo. Estas enzimas, las cuales pueden ser biológicamente funcionales, son comunes a ambos tipos de exosomas, lo que ayudaría a la generación de estas ROS.

En resumen, en esta parte del estudio se ha confirmado cómo los exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos son captados e internalizados por los propios eosinófilos, induciendo cambios en diversas funciones celulares asociadas con el asma. Por otra parte, la presencia de exosomas de

individuos sanos no afecta a las células del mismo modo que lo hacen los exosomas de origen asmático. Así, estos exosomas eosinofílicos derivados de pacientes con asma inducen una regulación autocrina pudiendo contribuir, entre otras cosas, al establecimiento y exacerbación de la enfermedad.

5.3. EFECTO E INTERACCIÓN DE LOS EXOSOMAS DE EOSINÓFILOS SOBRE LA ESTRUCTURA PULMONAR: CÉLULAS EPITELIALES Y MUSCULARES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS

El remodelado de las vías respiratorias junto a la hiperreactividad bronquial son unas de las principales características de la patología asmática. En estos procesos se encuentran implicadas, principalmente, las células del músculo liso bronquial y las células epiteliales de las vías respiratorias, aunque también participan diferentes células efectoras como los eosinófilos, los linfocitos Th2 y los mastocitos. Todas estas células son capaces de producir y liberar estímulos pro-contráctiles y mediadores pro-inflamatorios (IL-4, IL-9 e IL-13) que inducen la hipersecreción de moco, la hiperplasia de las células caliciformes y el incremento de la hiperreactividad de las vías respiratorias [222]. Todos estos procesos producen la alteración y el daño del epitelio respiratorio, la deposición sub-epitelial de colágeno y la hiperplasia de las células del músculo liso de las vías respiratorias [223], dando como resultado el engrosamiento de la pared bronquial y la reducción del flujo de aire.

El epitelio bronquial es la principal barrera contra las partículas, agentes nocivos y contaminantes del exterior, ejerciendo un papel esencial en la defensa del organismo. Cuando se produce un daño en el epitelio, estas células aumentan la expresión y secreción de varias citocinas como la TSLP, la IL-25, la IL-33 y las quimiocinas CCL11, CCL24 y CCL26, amplificando la respuesta Th2 y promoviendo el reclutamiento de varios tipos celulares hacia las vías respiratorias, entre los que se encuentran los eosinófilos.

Las células del músculo liso bronquial son las principales células efectoras de la regulación del tono broncomotor (broncodilatación y broncoconstricción) en respuesta a diversos neurotransmisores, mediadores pro-inflamatorios y otras sustancias exógenas [224]. Estas células también participan en la regulación del proceso inflamatorio de la mucosa mediante la secreción de citocinas, mediadores y enzimas pro-inflamatorias. La interacción entre las células del músculo liso de las vías respiratorias y los diferentes factores del medio genera cambios en la contractilidad de la musculatura, produciendo tanto hipertrofia como hiperplasia, que son alteraciones características de la patología asmática [225]. Los diferentes estímulos provocan la modificación y el engrosamiento de la capa muscular lisa, generando un estrechamiento de las vías respiratorias y produciendo, en último lugar, la obstrucción variable del flujo respiratorio, característica patognomónica del asma.

Debido a la importancia de estos dos tipos celulares en el asma, en el presente trabajo se ha demostrado el papel que ejercen los exosomas derivados de eosinófilos de pacientes asmáticos sobre estas células estructurales, modificando varios de los procesos característicos de dichas células y

alterando el patrón de expresión de varias citocinas y moléculas asociadas al remodelado de las vías respiratorias.

Al estudiar el mecanismo de actuación de los exosomas en estos dos tipos celulares, se demostró que los exosomas se internalizan al interior celular donde ejercerán sus funciones (Fig. 48 y 54). Principalmente, existen dos tipos de mecanismos por los cuales los exosomas pueden desempeñar su función sobre las células: mediante la internalización de las nanovesículas completas hacia el citoplasma, o por la fusión de las membranas del exosoma y de la célula, y el posterior vertido del contenido de los exosomas hacia el citoplasma [226]. El mecanismo más común suele ser la endocitosis de las vesículas completas, ya sea mediada por clatrina, por balsas lipídicas, por caveolina, por macropinocitosis o por fagocitosis y, concretamente, en el caso de las células estructurales del pulmón se ha demostrado que este es el mecanismo principal de captación de exosomas [207]. Sin embargo, los procesos concretos que ocurren deberían ser objeto de estudio en mayor profundidad.

Al demostrar que los exosomas de sujetos sanos también eran captados por las células estructurales del pulmón, se evaluaron los efectos que ejercían este tipo de exosomas sobre dichas células. Se comprobó que no existía ninguna alteración significativa en los procesos estudiados. Probablemente, la falta de efectos puede ser debida al estado de activación de los eosinófilos, ya que en la patología asmática estas células se encuentran activadas a causa de todos los estímulos específicos presentes en el microambiente inflamatorio pulmonar de los individuos asmáticos [227].

5.3.1. Efecto de los exosomas eosinofílicos de origen asmático sobre las células epiteliales de vías respiratorias pequeñas

Una de las consecuencias del remodelado bronquial es la generación de daño en el epitelio respiratorio. La cicatrización disfuncional de la herida ha demostrado que puede desencadenar las características patognomónicas del asma, lo cual sugiere que la reparación epitelial es esencial para mantener la funcionalidad inmunológica del epitelio contra agentes externos. Es conocido que los eosinófilos activados liberan productos tóxicos, entre los que se encuentran las proteínas catiónicas, que inducen daño en las células del epitelio respiratorio [228], por lo que se pensó que los exosomas eosinofílicos de pacientes asmáticos podrían ejercer los mismos efectos que los eosinófilos *per se*, retrasando la cicatrización de la herida e induciendo la apoptosis epitelial, seguramente, promovido por la presencia de proteínas básicas contenidas en los exosomas. Cuando los exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos estuvieron presentes en el medio, promovieron la apoptosis de las células epiteliales y el retraso de la reparación del daño epitelial establecido, prolongando el daño tisular y el estado de inflamación (Fig. 40, 41 y 42).

El epitelio respiratorio, además de servir como barrera protectora, es capaz de orquestar la respuesta inflamatoria liberando diversas moléculas pro-inflamatorias [42,229]. En el presente estudio se ha demostrado que los exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos son capaces de aumentar la

Discusión

expresión de genes importantes en la respuesta inflamatoria por parte de las SAEC, manteniendo elevada su expresión cuando el daño está establecido, de manera que podría asemejarse a episodios de exacerbación del asma [230,231].

En la aproximación experimental y simulación de las etapas tempranas del asma (SAEC en presencia de exosomas de pacientes asmáticos sin daño epitelial establecido), existió un aumento rápido de la *CCL26* y la *POSTN*, mientras que la expresión de *TNF* se incrementó a tiempos más largos (Fig. 43). Esto parece indicar que, en estadios tempranos de la enfermedad, estas células ayudan al reclutamiento de leucocitos, entre los que se encuentran los eosinófilos, generando un ambiente de inflamación. Sin embargo, en la simulación de estadios tardíos de la enfermedad (con daño epitelial presente), las SAEC en presencia de exosomas de pacientes asmáticos originaron un incremento rápido de la expresión de genes que codifican citocinas pro-inflamatorias como el *TNF*, que ayuda al mantenimiento del estatus inflamatorio, en detrimento de otras quimiocinas que fueron producidas a tiempos más largos para continuar con el reclutamiento de leucocitos hasta el sitio de inflamación (Fig. 45). En el contexto del asma, este aumento de la expresión de factores pro-inflamatorios y quimiocinas favorecería la aparición de inflamación y de eosinofilia, generando un bucle inflamatorio asociado a la gravedad de la enfermedad [232,233].

La periostina es una proteína de 90 kDa de la matriz extracelular, que interactúa con múltiples integrinas, estando involucrada en diferentes procesos como la fibrosis [234]. En el modelo propuesto en este estudio de las SAEC, el incremento de la expresión de la periostina está provocado por la presencia de los exosomas procedentes de pacientes asmáticos. Esta proteína podría estar actuando como una matriz de unión celular aumentando el infiltrado celular inflamatorio, lo que facilitaría el paso de los eosinófilos hacia los tejidos, creando una retroalimentación inflamatoria y potenciando el estatus de inflamación pulmonar. Estudios previos han confirmado una mayor expresión de la periostina en las vías respiratorias de los pacientes asmáticos en comparación a la de los individuos sanos, existiendo una correlación positiva entre los eosinófilos y el fenotipo Th2 [232,235].

El $TNF-\alpha$ es una citocina que modula la inflamación, favoreciendo el estado patológico de diversas enfermedades como el asma. Su acción es especialmente importante en diferentes procesos como la acumulación de leucocitos, el estrés oxidativo, la apoptosis, la proliferación celular y el remodelado de los tejidos [236,237]. Principalmente, es producida por macrófagos y monocitos [238,239], aunque también puede ser generada por otros tipos celulares, incluyendo las células epiteliales de las vías respiratorias [240]. En el presente estudio, el hecho de que las células epiteliales incrementen la expresión de esta citocina en presencia de exosomas de pacientes asmáticos, estaría favoreciendo el aumento de la apoptosis descrito en estas células. Aparte de actuar como citocina pro-inflamatoria, ejerce un efecto quimioatrayente sobre los eosinófilos [241], al igual que la eotaxina-3/CCL26. Por lo tanto, el aumento de expresión de estas citocinas y quimiocinas en las células epiteliales en presencia de exosomas procedentes de eosinófilos purificados de pacientes asmáticos, confirma el papel de dichos exosomas como agentes promotores de la inflamación.

Los procesos alterados por la acción de los exosomas de origen asmático en las células epiteliales están regulados por diversas vías de señalización. Diferentes estudios han demostrado el papel de las vías PI3K/AKT y JAK/STAT en el desarrollo de las características del asma. Estas vías se han vinculado con procesos tales como la supervivencia celular, el crecimiento y la proliferación, la migración, la motilidad y la cicatrización del daño epitelial [242-245].

En el presente estudio se ha descrito que en las SAEC, a las 24 h, existe una disminución del estado de fosforilación de dos factores claves en estas vías: STAT3 y AKT, debido a la acción de los exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos (Fig. 47). Esta disminución de la fosforilación de ambos factores podría estar relacionada con el aumento en la apoptosis de las células epiteliales observado a las 24 h (Fig. 40 y 41), así como con la pérdida de motilidad y migración que generan el retraso en la cicatrización de la herida en el mismo punto temporal (Fig. 42). Estos resultados concuerdan con los conocimientos previos que se tienen sobre estos factores, ya que STAT3 ejerce un papel anti-apoptótico, activando diferentes mecanismos que bloquean la muerte celular [246] y promoviendo la regeneración epitelial después del daño [247]. Por otro lado, el factor de señalización AKT ha sido caracterizado como un elemento crítico en la regulación y el bloqueo de la apoptosis, así como en el mantenimiento de la supervivencia celular [248]. También, se ha descrito que la cicatrización epitelial es dependiente de los niveles celulares de pAKT, y la presencia de inhibidores de la fosforilación de este factor atenúan la reparación del epitelio [244].

En resumen, se ha demostrado que los exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos modifican diferentes funciones de las células epiteliales de las vías respiratorias: aumentan la apoptosis de estas células y disminuyen la capacidad de reparación del daño establecido, incrementan la expresión génica de citocinas y de moléculas pro-inflamatorias, y alteran los niveles de fosforilación de los factores AKT y STAT3.

5.3.2. Efecto de los exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos sobre las células del músculo liso bronquial

La proliferación de las células del músculo liso bronquial contribuye al remodelado de las vías respiratorias, siendo el principal factor etiológico en el estrechamiento de las vías respiratorias que acompañan a esta enfermedad [249].

En este estudio se ha demostrado que los exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos participan activamente en la hiperplasia de las células del músculo liso bronquial. Aunque a las 24 y 48 h no se observaron cambios en la proliferación, sí que existía un aumento a las 72 h en las células cultivadas con exosomas de origen asmático (Fig. 49). Aunque no existen estudios previos realizados con exosomas de eosinófilos, sí que se han descrito propiedades proliferativas de los exosomas procedentes de otros tipos celulares sobre las células del músculo liso del pulmón. Un estudio realizado en células del músculo liso de las vías respiratorias de caballo demostró que los exosomas

Discusión

liberados por los neutrófilos modulan la apoptosis e inducen la proliferación de estas células, contribuyendo al proceso de remodelado de las vías respiratorias [207].

Pese a que los mecanismos que regulan estos procesos de proliferación no están completamente establecidos, sí se conoce la relación que existe entre la expresión del factor pERK1/2, de la familia de las MAPK, y los procesos de crecimiento, proliferación, migración y apoptosis [250,251]. En el modelo planteado en el presente trabajo, se demuestra la vinculación existente entre el incremento de la proliferación de las BSMC en presencia de exosomas de pacientes asmáticos y la activación de la vía ERK1/2 (Fig. 50). Estos resultados quedaron respaldados por los ensayos de inhibición de la fosforilación del factor ERK1/2, en los cuales la proliferación de las BSMC disminuyó cuando estas células se incubaron con un inhibidor específico de pERK1/2 previo a la adición de los exosomas de origen asmático (Fig. 51). En este contexto, otros estudios han descrito la regulación de la proliferación de las células del músculo liso bronquial mediante las vías de señalización ERK y PI3K [252], así como la relación existente entre la proliferación de estas células y la vía ERK1/2, donde las células del músculo liso bronquial de pacientes asmáticos tienen una mayor actividad de esta vía que las procedentes de los sujetos sanos [253], avalando los resultados encontrados en el presente estudio.

Por otra parte, las células del músculo liso bronquial contribuyen al establecimiento de la inflamación liberando al medio extracelular diversas moléculas pro-inflamatorias y otros mediadores implicados en el remodelado bronquial. Por esta razón, se evaluó la expresión de ciertos genes relevantes en la patología asmática, en las células del músculo liso bronquial, en presencia o no de exosomas de eosinófilos de origen asmático. En este caso concreto, se observó que existían dos genes cuya expresión estaba aumentada en estas células a las 24 h debido a la presencia de los exosomas de pacientes asmáticos: *CCR3* y *VEGFA* (Fig. 52).

La vinculación de CCR3 al proceso de proliferación a través de la cascada de las MAPK ha sido previamente descrita [254]. La unión a este receptor de varias quimiocinas como eotaxinas, RANTES, MCP-2 y la proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta (MIP-1 δ), induce la activación de diferentes vías de señalización, entre las que se encuentra la vía de las MAPK. Con estos resultados, cabría esperar que el incremento de la proliferación anormal de las células del músculo liso bronquial observado en presencia de exosomas de pacientes asmáticos, pudiera ocurrir a través de CCR3, que induciría la fosforilación de ERK1/2 generando la proliferación de las células [255,256]. Además de este receptor, se observó un aumento de la expresión génica de *VEGFA* en presencia de exosomas de pacientes asmáticos. Este factor juega un papel importante en el remodelado bronquial y en la angiogénesis [257]. Por lo tanto, el aumento de su expresión demuestra, una vez más, la implicación de los exosomas de eosinófilos de origen asmático en otro de los procesos característicos de la patología asmática: la angiogénesis.

Esta parte del estudio confirma la repercusión que tienen los exosomas de pacientes asmáticos sobre las células del músculo liso bronquial, incrementando su proliferación mediante la activación de la vía

de señalización ERK1/2 y aumentando la expresión génica de varios factores asociados a los procesos del remodelado bronquial y de la angiogénesis.

5.4. IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL DIFERENCIAL DE miARN ENTRE EOSINÓFILOS DE SUJETOS SANOS Y ASMÁTICOS

Existen otras moléculas potencialmente importantes en el control y establecimiento del asma: los miARN. Estos pequeños ARN no codificantes ejercen una regulación sobre la expresión de múltiples genes implicados en diversos mecanismos celulares, reprimiendo la traducción y regulando numerosos procesos, tanto en condiciones homeostáticas como patológicas [258,259].

Durante los últimos años, numerosos trabajos han establecido una relación entre los miARN y las enfermedades pulmonares como el asma. Estos estudios se han desarrollado en diferentes tipos celulares como linfocitos, células epiteliales y del músculo liso de las vías respiratorias, células mononucleares de sangre periférica, y en diversas muestras biológicas como suero, lavados broncoalveolares y condensado de aire exhalado [260,261]. Sin embargo, no existen estudios de miARN específicos de eosinófilos y asma. Debido a esta limitación, esta parte del trabajo se focalizó en el estudio comparativo del perfil de miARN que existía entre los eosinófilos procedentes de sujetos sanos y de pacientes asmáticos. De la misma manera, se determinó cuáles de esos miARN estaban diferencialmente expresados en los exosomas secretados por los eosinófilos.

El análisis del perfil completo de miARN presentes en eosinófilos se realizó mediante secuenciación de nueva generación. Esto confiere una ventaja a este estudio, ya que la mayor parte de los trabajos elaborados utilizan un panel preestablecido de miARN [262,263], lo que limita el número de miARN descritos; sin embargo, con la secuenciación masiva no existe tal limitación, ya que se obtiene el perfil completo de miARN presente en la muestra. Esto posibilita la obtención de un análisis y unos resultados más específicos y sin ningún sesgo.

Inicialmente, se observaron 24 posibles miARN diferencialmente expresados entre sujetos sanos y pacientes asmáticos. Tras la validación y confirmación por RT-qPCR en una cohorte mayor, se describió un perfil de 14 miARN eosinofílicos alterado entre ambas condiciones (Fig. 55). Entre los 14 miARN reseñados, existen algunos que han sido previamente descritos y asociados a la patología asmática como miR-21-5p, miR-185-5p, miR-146b y miR-629-5p [264-266], mientras que otros se postulan como nuevos candidatos. El miR-21 es uno de los mejor estudiados, ya que este miARN se encuentra aumentado en las vías respiratorias de asmáticos y está asociado al aumento de la eosinofilia, promoviendo el crecimiento de los precursores de los eosinófilos. Esto lo convierte en una posible diana terapéutica para el tratamiento del asma [267], concretamente, del asma eosinofílica. Aunque de manera colectiva se han identificado más de 90 miARN diferencialmente expresados entre las condiciones sano y asma [106,262,268], este es el primer estudio realizado con miARN eosinofílicos en el contexto de la patología asmática, siendo el presente trabajo pionero en este campo.

Discusión

La expresión diferencial de miARN entre pacientes con asma e individuos no asmáticos es poco probable que sea solo un mero fenómeno epigenético, ya que está demostrado que los miARN afectan, directa o indirectamente, a la expresión de múltiples genes asociados con la respuesta inflamatoria [269,270]. Esta puede ser una de las razones por las cuales el perfil identificado de miARN de eosinófilos es capaz de discriminar entre las condiciones de estudio (Fig. 56).

Estudiando más en detalle los grupos constituidos, se puede observar que el perfil de miARN de eosinófilos no solo es capaz de distinguir los grupos sano y asma sino que, dentro del grupo de los asmáticos, existe una división que da lugar a dos subgrupos (Fig. 56). Al analizar los parámetros clínicos de los individuos pertenecientes a cada subgrupo de estudio, se observaron diferencias en el porcentaje de eosinófilos en sangre periférica y en los niveles de periostina en plasma (Fig. 57). La periostina está considerada como un biomarcador de la inflamación de las vías respiratorias y su expresión está aumentada en el asma. Además, niveles altos de periostina en suero se han asociado con una mayor disminución de la función pulmonar de los pacientes asmáticos [271]. Teniendo en cuenta estos dos parámetros, se puede clasificar a los individuos asmáticos en dos endotipos diferentes: Th2 “bajo” (menor gravedad y ausencia de eosinofilia) y Th2 “alto” (mayor gravedad y eosinofilia sistémica) [22]. Según esta clasificación y en base a los resultados obtenidos, el perfil de miARN establecido en este estudio podría distinguir diferentes niveles de gravedad dentro de la patología.

Los exosomas transportan miARN en su interior, los cuales ejercen una función génica reguladora muy importante en las células diana [106]. Por ello, se evaluaron en los exosomas eosinofílicos de origen sano y asmático los 14 miARN diferenciales encontrados en eosinófilos (Fig. 58). Entre los miARN alterados se encontró el miR-5100, el cual se encuentra aumentado en sujetos con patologías pulmonares, como el cáncer de pulmón de células no pequeñas [272], aunque no hay nada previamente descrito en el asma. Varios de los miARN diferencialmente expresados en estos exosomas (miR-320a, miR-21-5p y miR-185-5p) tienen un papel conocido en la inflamación y en el asma [273], mientras que otros podrían ser considerados como nuevos candidatos potenciales para ser biomarcadores en esta enfermedad (miR-1246 y miR-1290).

Las diferencias de expresión entre los miARN de exosomas de ambos orígenes permiten separar a los dos grupos de estudio (sano y asma), como se demuestra en el análisis de componentes principales (Fig. 59), indicando que las diferencias observadas en la expresión están asociadas con la patología. Estos resultados están respaldados por otro estudio donde se describe un conjunto de miARN exosomales capaz de discriminar la condición de asma alérgico de la condición de sano [106].

En resumen, se ha descrito la existencia de un perfil diferencial de 14 miARN de origen eosinofílico entre sujetos sanos y pacientes asmáticos, el cual discrimina ambos estatus. Entre estos miARN existen algunos ya descritos y otros que se postulan como nuevos candidatos. Asimismo, varios de estos miARN se han encontrado alterados entre exosomas eosinofílicos de ambas condiciones, lo

que podría ser una de las razones que explicarían los efectos que tienen los exosomas de sujetos asmáticos sobre los propios eosinófilos y sobre las células estructurales del pulmón.

De los resultados derivados de la tesis se puede concluir que los exosomas de eosinófilos de pacientes asmáticos participan en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria en las vías respiratorias, incrementando la activación y el reclutamiento de eosinófilos de sangre periférica hacia los pulmones (1, 2 y 3; Fig. 60). Una vez allí, estos leucocitos ejercen sus efectos pro-inflamatorios sobre las células estructurales del pulmón, amplificando su acción por medio de los exosomas (4 y 5; Fig. 60). Esto establece una retroalimentación positiva que aumenta la expresión de diferentes factores implicados en el asma, promoviendo la expansión de la respuesta inflamatoria mediante el incremento de la infiltración celular y el remodelado de las vías respiratorias, lo que conduce al establecimiento de un estado de inflamación crónico (Fig. 60).

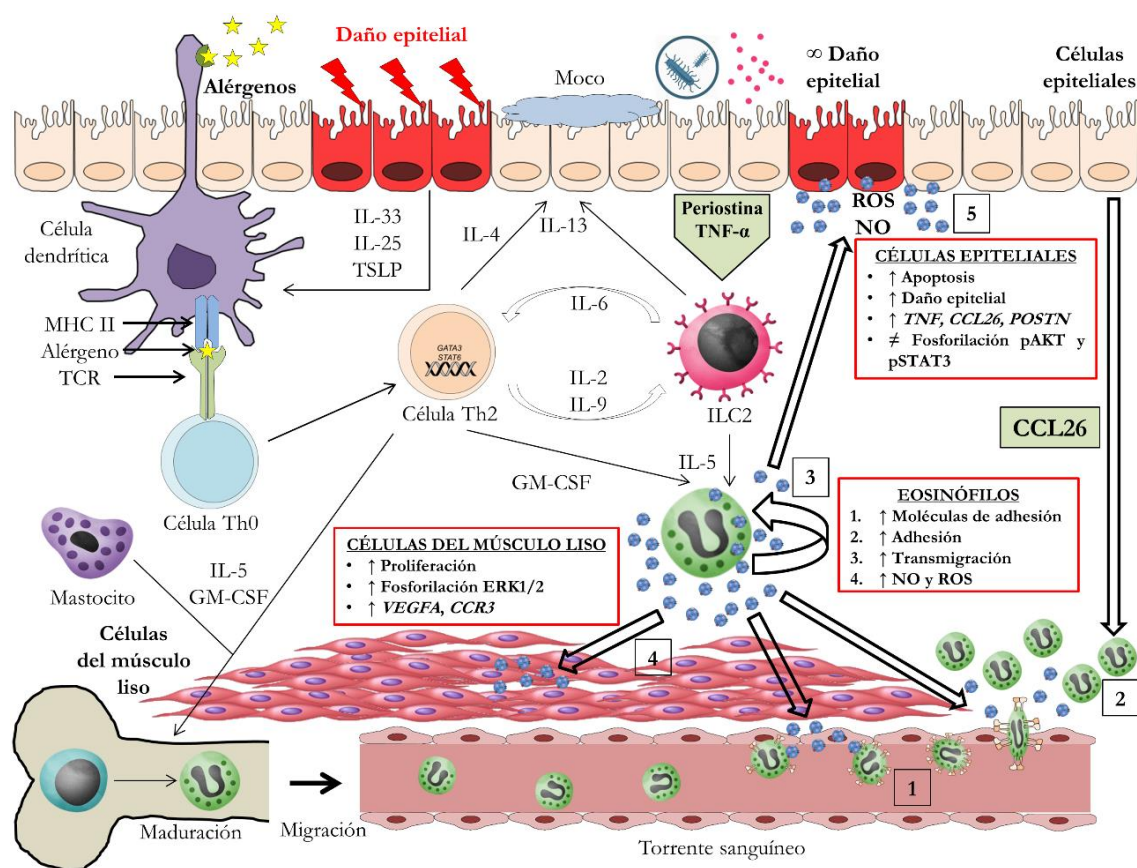
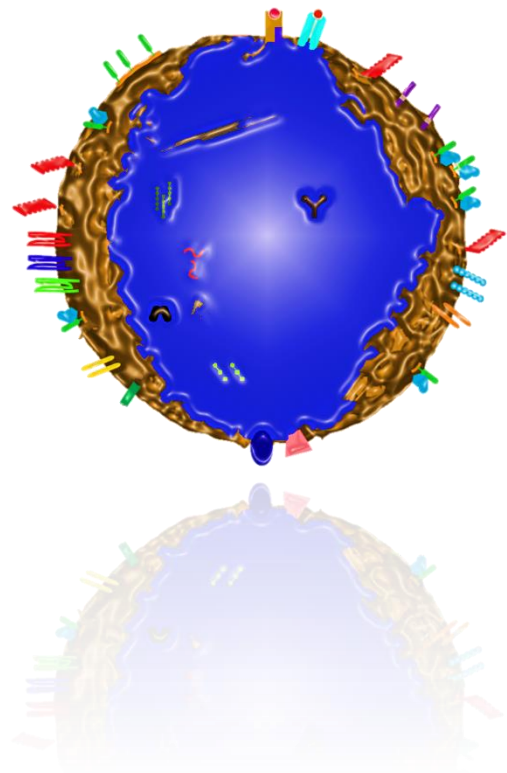


Figura 60. Esquema de los procesos alterados, en los diferentes tipos celulares estudiados, por la acción de los exosomas de pacientes asmáticos. Los exosomas liberados por los eosinófilos de origen asmático son capaces de alterar diferentes funciones asociadas con las características de la patología asmática en los propios eosinófilos, en las células epiteliales y en las células del músculo liso bronquial.

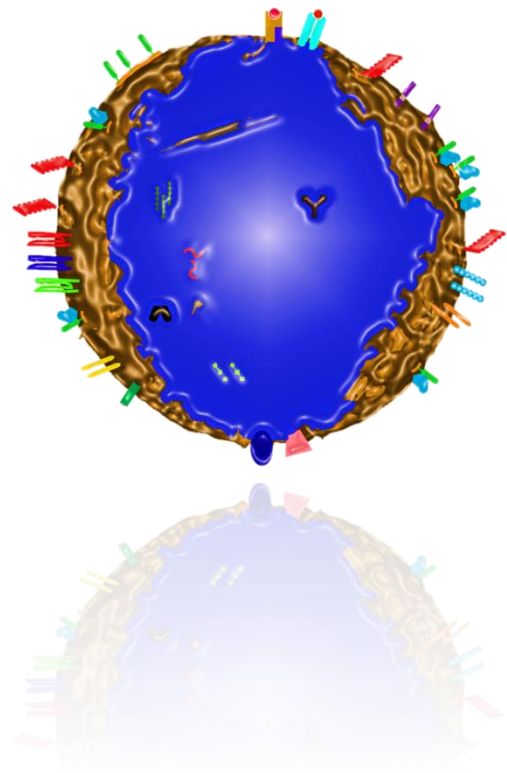


6. CONCLUSIONES

Los eosinófilos de pacientes asmáticos son capaces de liberar exosomas al medio extracelular y actuar sobre los propios eosinófilos de manera autocrina, así como sobre otras células que forman parte de la estructura pulmonar y que participan de una manera fundamental en los procesos asociados a la patología asmática. Además, estos eosinófilos tienen un perfil diferencial de miARN capaz de discriminar a los pacientes asmáticos de los individuos sanos.

Esta conclusión principal se sustenta en las siguientes conclusiones parciales:

1. Los eosinófilos, tanto de pacientes asmáticos como de individuos sanos, son capaces de liberar exosomas al medio extracelular.
2. La cantidad de exosomas secretada por los eosinófilos de pacientes con asma es significativamente superior que la liberada por los eosinófilos procedentes de sujetos no asmáticos.
3. Los exosomas secretados por los eosinófilos de origen asmático tienen una repercusión sobre la funcionalidad de dichas células, incrementando su capacidad de migración y adhesión, así como la producción de óxido nítrico y de especies reactivas de oxígeno, procesos que contribuyen al daño pulmonar.
4. Estos exosomas son capaces de retardar la reparación del daño epitelial establecido, así como de inducir hiperplasia en las células del músculo liso bronquial. Además, aumentan la expresión génica de ciertas citocinas y moléculas pro-inflamatorias y producen la alteración del patrón de fosforilación de factores de señalización implicados en el asma.
5. Los exosomas liberados por eosinófilos de sujetos sanos tienen un comportamiento diferente al observado en los que proceden de eosinófilos de pacientes asmáticos, no ejerciendo cambios significativos en las células receptoras.
6. Se ha definido una firma de miARN con expresión diferencial entre los eosinófilos de individuos sanos y de pacientes asmáticos, permitiendo diferenciar ambas condiciones.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Quirce S, Pérez E, Carrillo T. Capítulo 4: Mecanismos patogénicos. En Quirce S, Carrillo T, Olaguibel JM. Asma. Volumen I: Ciencia básica y patogenia, 1ª edición, Barcelona, MRA ediciones; 2004. págs. 57-74.
2. A plea to abandon asthma as a disease concept. *Lancet* 2006; **368**(9537):705.
3. Nauta AJ, Engels F, Knippels LM, Garssen J, Nijkamp FP, Redegeld FA. Mechanisms of allergy and asthma. *Eur J Pharmacol* 2008; **585**(2-3):354-360.
4. Moffatt MF. Genes in asthma: new genes and new ways. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; **8**(5):411-417.
5. Bousquet J, Clark TJ, Hurd S, Khaltaev N, Lenfant C, O'Byrne P, Sheffer A. GINA guidelines on asthma and beyond. *Allergy* 2007; **62**(2):102-112.
6. Naberan Toña K. Diferencias entre el asma y la enfermedad obstructiva crónica. *Aten Primaria* 2002; **30**(10):648-654.
7. GINA. Global strategy for asthma management and prevention. Update from NHBL/WHO Workshop Report 1995. Revised 2017.
8. Romieu I. Nutrition and lung health. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; **9**(4):362-374.
9. Martinez FD. Genes, environments, development and asthma: a reappraisal. *Eur Respir J* 2007; **29**(1):179-184.
10. D'Amato G, Cecchi L. Effects of climate change on environmental factors in respiratory allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 2008; **38**(8):1264-1274.
11. Ciencewicky J, Trivedi S, Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008; **122**(3):456-468.
12. Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med* 2001; **344**(5):350-362.
13. Sanz ML, García MC. Capítulo 3: Inmunobiología del asma. En Quirce S, Carrillo T, Olaguibel JM. Asma. Volumen I: Ciencia básica y patogenia, 1ª edición, Barcelona, MRA ediciones; 2004. págs. 39-56.
14. National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Summary Report 2007. *J Allergy Clin Immunol* 2007; **120**(5 Suppl):S94-138.

Bibliografía

15. Vignola AM, Gagliardo R, Guerrera D, Chiappara G, Chanez P, Bousquet J, Bonsignore G. New evidence of inflammation in asthma. *Thorax* 2000; **55** Suppl 2:S59-60.
16. Kay AB. "Helper" (CD4+) T cells and eosinophils in allergy and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992; **145**(2 Pt 2):S22-26.
17. Ngoc PL, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedón JC. Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; **5**(2):161-166.
18. Licona-Limón P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2013; **14**(6):536-542.
19. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 2012; **18**(5):716-725.
20. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, D'Agostino R Jr, Castro M, Curran-Everett D, Fitzpatrick AM, Gaston B, Jarjour NN, Sorkness R, Calhoun WJ, Chung KF, Comhair SA, Dweik RA, Israel E, Peters SP, Busse WW, Erzurum SC, Bleecker ER; National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; **181**(4):315-323.
21. Bel EH. Clinical phenotypes of asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2004; **10**(1):44-50.
22. Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol* 2015; **15**(1):57-65.
23. Agache IO. From phenotypes to endotypes to asthma treatment. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013; **13**(3):249-256.
24. Corren J. Asthma phenotypes and endotypes: an evolving paradigm for classification. *Discov Med* 2013; **15**(83):243-249.
25. Samitas K, Zervas E, Gaga M. T2-low asthma: current approach to diagnosis and therapy. *Curr Opin Pulm Med* 2017; **23**(1):48-55.
26. McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA, Holt PG. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med* 1994; **179**(4):1331-1336.
27. Hammad H, Plantinga M, Deswarte K, Pouliot P, Willart MA, Kool M, Muskens F, Lambrecht BN. Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient

- for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med* 2010; **207**(10):2097-2111.
28. Trompette A, Divanovic S, Visintin A, Blanchard C, Hegde RS, Madan R, Thorne PS, Wills-Karp M, Gioannini TL, Weiss JP, Karp CL. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* 2009; **457**(7229):585-588.
29. Liu Y-J. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med* 2006; **203**(2):269-273.
30. Angkasekwinai P, Park H, Wang YH, Wang YH, Chang SH, Corry DB, Liu YJ, Zhu Z, Dong C. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J Exp Med* 2007; **204**(7):1509-1517.
31. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005; **23**(5):479-490.
32. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 1990; **145**(11):3796-3806.
33. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* 2012; **18**(5):673-683.
34. Khan MA. Inflammation signals airway smooth muscle cell proliferation in asthma pathogenesis. *Multidiscip Respir Med* 2013; **8**(1):11.
35. Malavia NK, Raub CB, Mahon SB, Brenner M, Panettieri RA, George SC. Airway Epithelium Stimulates Smooth Muscle Proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; **41**(3):297-304.
36. Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004; **1**(3):176-183.
37. Sumi Y, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Allergol Int* 2007; **56**(4):341-348.
38. Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **164**(10 Pt 2):S28-38.
39. Johnson PR. Role of human airway smooth muscle in altered extracellular matrix production in asthma. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; **28**(3):233-236.

Bibliografía

40. Kaur D, Hollins F, Saunders R, Woodman L, Sutcliffe A, Cruse G, Bradding P, Brightling C. Airway smooth muscle proliferation and survival is not modulated by mast cells. *Clin Exp Allergy* 2010; **40**(2):279-288.
41. Knox AJ. Human airway smooth muscle cells secrete vascular endothelial growth factor: up-regulation by bradykinin via a protein kinase C and prostanoid-dependent mechanism. *FASEB J* 2001; **15**(13):2480-2488.
42. Cho JY. Recent Advances in Mechanisms and Treatments of Airway Remodeling in Asthma: A Message from the Bench Side to the Clinic. *Korean J Intern Med* 2011; **26**(4):367-383.
43. Iosifidis T, Garratt LW, Coombe DR, Knight DA, Stick SM, Kicic A. Airway epithelial repair in health and disease: Orchestrator or simply a player?. *Respirology* 2016; **21**(3):438-448.
44. Barnes PJ. Th2 cytokines and asthma: an introduction. *Respir Res* 2001; **2**(2):64-65.
45. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med* 2012; **18**(5):684-692.
46. Pohunek P, Warner JO, Turzíkova J, Kudrmann J, Roche WR. Markers of eosinophilic inflammation and tissue re-modelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; **16**(1):43-51.
47. Del Pozo V, Lahoz C. Capítulo 7: Eosinófilos. En Quirce S, Carrillo T, Olaguibel JM. Asma. Volumen I: Ciencia básica y patogenia, 1ª edición, Barcelona, MRA ediciones; 2004. págs. 119-131.
48. Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP. Asthma. *Lancet* 2002; **360**(9342):1313-1322.
49. Scott KA, Wardlaw AJ. Eosinophilic airway disorders. *Semin Respir Crit Care Med* 2006; **27**(2):128-133.
50. Jacobsen EA, Lee NA, Lee JJ. Re-defining the unique roles for eosinophils in allergic respiratory inflammation. *Clin Exp Allergy* 2014; **44**(9):1119-1136.
51. Brito F, Yamazaki MA, Espinosa S, Vázquez O, Huerta J, Berrón R. Eosinófilos: Revisión de la literatura. *Alergia e Inmunol Pediatr* 2003; **12**(2):56-62.
52. Lampinen M, Carlson M, Håkansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* 2004; **59**(8):793-805.

53. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998; **338**(22):1592-1600.
54. Tuneu A. El eosinófilo. Estructura, función y su participación en patología cutánea. *Piel* 1987; **2**:233-240.
55. Hoffman H, Broide DH. Eosinophilia in children's. *Immunol Clin North Am* 1997; **17**(2):25-53.
56. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; **81**(11):2844-2853.
57. de Vries JE. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol* 1998; **102**(2):165-169.
58. Horie S, Okubo Y, Hossain M, Sato E, Nomura H, Koyama S, Suzuki J, Isobe M, Sekiguchi M. Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. *Intern Med* 1997; **36**(3):179-185.
59. Walsh GM. Eosinophil apoptosis and clearance in asthma. *J Cell Death* 2013; **6**:17-25.
60. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2012; **13**(1):9-22.
61. Varricchi G, Bagnasco D, Borriello F, Heffler E, Canonica GW. Interleukin-5 pathway inhibition in the treatment of eosinophilic respiratory disorders: evidence and unmet needs. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2016; **16**(2):186-200.
62. Foster PS, Hogan SP, Yang M, Mattes J, Young IG, Matthaei KI, Kumar RK, Mahalingam S, Webb DC. Interleukin-5 and eosinophils as therapeutic targets for asthma. *Trends Mol Med* 2002; **8**(4):162-167.
63. Del Pozo V, De Andrés B, Martín E, Cárdbaba B, Fernández JC, Gallardo S, Tramón P, Leyva-Cobian F, Palomino P, Lahoz C. Eosinophil as antigen-presenting cell: activation of T cell clones and T cell hybridoma by eosinophils after antigen processing. *Eur J Immunol* 1992; **22**(7):1919-1925.
64. Del Pozo V, De Andres B, Martin E, Maruri N, Zubeldia JM, Palomino P, Lahoz C. Murine eosinophils and IL-1: alpha IL-1 mRNA detection by in situ hybridization. Production and release of IL-1 from peritoneal eosinophils. *J Immunol* 1990; **144**(8):3117-3122.
65. Kay AB, Barata L, Meng Q, Durham SR, Ying S. Eosinophils and eosinophil-associated cytokines in allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; **113**(1-3):196-199.

Bibliografía

66. de Andres B, del Pozo V, Martin E, Palomino P, Lahoz C. Release of O₂- and LTC₄ by murine eosinophils: role of intra- and extracellular calcium. *Immunology* 1990; **69**(2):271-276.
67. del Pozo V, de Arruda-Chaves E, de Andrés B, Cárđaba B, López-Farré A, Gallardo S, Cortegano I, Vidarte L, Jurado A, Sastre J, Palomino P, Lahoz C. Eosinophils transcribe and translate messenger RNA for inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 1997; **158**(2):859-864.
68. Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil Granule Proteins: Form and Function. *J Biol Chem* 2014; **289**(25):17406-17415.
69. Melo RC, Perez SA, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF. Intragranular vesiculotubular compartments are involved in piecemeal degranulation by activated human eosinophils. *Traffic* 2005; **6**(10):866-879.
70. Melo RC, Spencer LA, Perez SA, Ghiran I, Dvorak AM, Weller PF. Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments. *Traffic* 2005; **6**(11):1047-1057.
71. Spencer LA, Melo RC, Perez SA, Bafford SP, Dvorak AM, Weller PF. Cytokine receptor-mediated trafficking of preformed IL-4 in eosinophils identifies an innate immune mechanism of cytokine secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**(9):3333-3338.
72. Spencer LA, Bonjour K, Melo RC, Weller PF. Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. *Front Immunol* 2014; **5**:496.
73. Pazdrak K, Young TW, Straub C, Stafford S, Kurosky A. Priming of eosinophils by GM-CSF is mediated by protein kinase C β II-phosphorylated L-plastin. *J Immunol* 2011; **186**(11):6485-6496.
74. Bandeira-Melo C, Hall JC, Penrose JF, Weller PF. Cysteinyl leukotrienes induce IL-4 release from cord blood-derived human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2002; **109**(6):975-979.
75. Dvorak HF, Dvorak AM. Basophilic leucocytes: structure, function and role in disease. *Clin Haematol* 1975; **4**(3):651-683.
76. Persson C, Uller L. Theirs but to die and do: primary lysis of eosinophils and free eosinophil granules in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; **189**(6):628-633.
77. Erjefält JS, Greiff L, Andersson M, Adelroth E, Jeffery PK, Persson CG. Degranulation patterns of eosinophil granulocytes as determinants of eosinophil driven disease. *Thorax*

- 2001; **56**(5):341-344.
78. Saffari H, Hoffman LH, Peterson KA, Fang JC, Leiferman KM, Pease LF, Gleich GJ. Electron microscopy elucidates eosinophil degranulation patterns in patients with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **133**(6):1728-1734.e1.
79. Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, Bernad A, Sánchez-Madrid F. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2011; **2**:282.
80. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, Baty CJ, Gibson GA, Erdos G, Wang Z, Milosevic J, Tkacheva OA, Divito SJ, Jordan R, Lyons-Weiler J, Watkins SC, Morelli AE. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 2012; **119**(3):756-766.
81. Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**(5):328-335.
82. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; **30**:255-289.
83. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2009; **21**(4):575-581.
84. Zha QB, Yao YF, Ren ZJ, Li XJ, Tang JH. Extracellular vesicles: An overview of biogenesis, function, and role in breast cancer. *Tumour Biol* 2017; **39**(2):1010428317691182.
85. Gould GW, Lippincott-Schwartz J. New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; **10**(4):287-292.
86. Klumperman J, Raposo G. The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; **6**(10):a016857.
87. Stoorvogel W, Strous GJ, Geuze HJ, Oorschot V, Schwartz AL. Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* 1991; **65**(3):417-427.
88. Raiborg C, Rusten TE, Stenmark H. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2003; **15**(4):446-455.
89. Jaiswal JK, Andrews NW, Simon SM. Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *J Cell Biol* 2002; **159**(4):625-635.

90. Hanson PI, Cashikar A. Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2012; **28**:337-362.
91. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brügger B, Simons M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 2008; **319**(5867):1244-1247.
92. Zhang B, Yin Y, Lai RC, Lim SK. Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles. *Front Immunol* 2014; **5**:518.
93. Kulshreshtha A, Ahmad T, Agrawal A, Ghosh B. Proinflammatory role of epithelial cell-derived exosomes in allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **131**(4):1194-1203.e14.
94. Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 1998; **273**(32):20121-20127.
95. Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 2001; **166**(12):7309-7318.
96. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Krämer-Albers EM, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Linē A, Lipps G, Llorente A, Lötval J, Manček-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-'t Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Olivan M, Oliveira C, Pállinger É, Del Portillo HA, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K, Ostensfeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 2015; **4**:27066.
97. Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, Filén JJ, Lahesmaa R, Norman M, Neve EP, Scheynius A, Gabrielsson S. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol* 2007; **179**(3):1969-1978.
98. Forterre A, Jalabert A, Chikh K, Pesenti S, Euthine V, Granjon A, Errazuriz E, Lefai E, Vidal H, Rome S. Myotube-derived exosomal miRNAs downregulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation. *Cell Cycle* 2014; **13**(1):78-89.

99. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int* 2010; **78**(9):838-848.
100. Baixauli F, López-Otín C, Mittelbrunn M. Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. *Front Immunol* 2014; **5**:403.
101. Lawson C, Vicencio JM, Yellon DM, Davidson SM. Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. *J Endocrinol* 2016; **228**(2):R57-71.
102. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplop N, Uryu K, Pharmed L, King T, Bojmar L, Davies AE, Ararso Y, Zhang T, Zhang H, Hernandez J, Weiss JM, Dumont-Cole VD, Kramer K, Wexler LH, Narendran A, Schwartz GK, Healey JH, Sandstrom P, Labori KJ, Kure EH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, de Sousa M, Kaur S, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Brady MS, Fodstad O, Muller V, Pantel K, Minn AJ, Bissell MJ, Garcia BA, Kang Y, Rajasekhar VK, Ghajar CM, Matei I, Peinado H, Bromberg J, Lyden D. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015; **527**(7578):329-335.
103. Hough KP, Chanda D, Duncan SR, Thannickal VJ, Deshane JS. Exosomes in immunoregulation of chronic lung diseases. *Allergy* 2017; **72**(4):534-544.
104. Torregrosa Paredes P, Esser J, Admyre C, Nord M, Rahman QK, Lukic A, Rådmark O, Grönneberg R, Grunewald J, Eklund A, Scheynius A, Gabrielsson S. Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma. *Allergy* 2012; **67**(7):911-919.
105. Admyre C, Bohle B, Johansson SM, Focke-Tejkl M, Valenta R, Scheynius A, Gabrielsson S. B cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells to proliferate and produce TH2-like cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2007; **120**(6):1418-1424.
106. Levänen B, Bhakta NR, Torregrosa Paredes P, Barbeau R, Hiltbrunner S, Pollack JL, Sköld CM, Svartengren M, Grunewald J, Gabrielsson S, Eklund A, Larsson BM, Woodruff PG, Erle DJ, Wheelock ÅM. Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **131**(3):894-903.
107. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; **75**(5):843-854.
108. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding

- p>for small expressed RNAs.
- Science*
- 2001;
- 294**
- (5543):853-858.
109. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; **294**(5543):858-862.
 110. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; **294**(5543):862-864.
 111. Suojalehto H, Lindström I, Majuri ML, Mitts C, Karjalainen J, Wolff H, Alenius H. Altered microRNA expression of nasal mucosa in long-term asthma and allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2014; **163**(3):168-178.
 112. Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int J Genomics* 2014; 2014:970607.
 113. Vidigal JA, Ventura A. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol* 2015; **25**(3):137-147.
 114. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**(Database issue):D152-157.
 115. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; **23**(20):4051-4060.
 116. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006; **13**(12):1097-1101.
 117. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; **425**(6956):415-419.
 118. Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, Yoneda Y, Tsukihara T. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* 2009; **326**(5957):1275-1279.
 119. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004; **10**(2):185-191.
 120. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; **303**(5654):95-98.

121. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; **17**(24):3011-3016.
122. Zeng Y, Cullen BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**(16):4776-4785.
123. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; **432**(7014):235-240.
124. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001; **293**(5531):834-838.
125. Knight SW, Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; **293**(5538):2269-2271.
126. Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**(8):475-488.
127. Kavitha N, Vijayarathna S, Jothy SL, Oon CE, Chen Y, Kanwar JR, Sasidharan S. MicroRNAs: biogenesis, roles for carcinogenesis and as potential biomarkers for cancer diagnosis and prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; **15**(18):7489-7497.
128. Alipoor SD, Adcock IM, Garssen J, Mortaz E, Varahram M, Mirsaeidi M, Velayati A. The roles of miRNAs as potential biomarkers in lung diseases. *Eur J Pharmacol* 2016; **791**:395-404.
129. Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One* 2012; **7**(3):e30679.
130. Pua HH, Ansel KM. MicroRNA regulation of allergic inflammation and asthma. *Curr Opin Immunol* 2015; **36**:101-108.
131. Sessa R, Hata A. Role of microRNAs in lung development and pulmonary diseases. *Pulm Circ* 2013; **3**(2):315-328.
132. Lu TX, Munitz A, Rothenberg ME. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *J Immunol* 2009; **182**(8):4994-5002.
133. Lu TX, Hartner J, Lim EJ, Fabry V, Mingler MK, Cole ET, Orkin SH, Aronow BJ, Rothenberg ME. MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the

- IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 2011; **187**(6):3362-3373.
134. Perry MM, Adcock IM, Chung KF. Role of microRNAs in allergic asthma: present and future. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2015; **15**(2):156-162.
135. Wang JW, Li K, Hellermann G, Lockey RF, Mohapatra S, Mohapatra S. Regulating the Regulators: microRNA and Asthma. *World Allergy Organ J* 2011; **4**(6):94-103.
136. Plaza Moral V, Comité Ejecutivo de GEMA. GEMA4.0. Guía española para el manejo del asma. *Arch Bronconeumol* 2015; **51** Suppl 1:2-54.
137. López E, Zafra MP, Sastre B, Gámez C, Fernández-Nieto M, Sastre J, Lahoz C, Quirce S, Del Pozo V. Suppressors of cytokine signaling 3 expression in eosinophils: regulation by PGE₂ and Th2 cytokines. *Clin Dev Immunol* 2011; **2011**:917015.
138. Sheldon H, Heikamp E, Turley H, Dragovic R, Thomas P, Oon CE, Leek R, Edelmann M, Kessler B, Sainson RC, Sargent I, Li JL, Harris AL. New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood* 2010; **116**(13):2385-2394.
139. Vallhov H, Gutzeit C, Johansson SM, Nagy N, Paul M, Li Q, Friend S, George TC, Klein E, Scheynius A, Gabrielsson S. Exosomes containing glycoprotein 350 released by EBV-transformed B cells selectively target B cells through CD21 and block EBV infection in vitro. *J Immunol* 2011; **186**(1):73-82.
140. Alonso R, Pisa D, Marina AI, Morato E, Rábano A, Rodal I, Carrasco L. Evidence for fungal infection in cerebrospinal fluid and brain tissue from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Biol Sci* 2015; **11**(5):546-558.
141. Alonso R, Pisa D, Marina AI, Morato E, Rábano A, Carrasco L. Fungal infection in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2014; **41**(1):301-311.
142. Simson L, Foster PS. Chemokine and cytokine cooperativity: Eosinophil migration in the asthmatic response. *Immunol Cell Biol* 2000; **78**(4):415-422.
143. Chomczynski P, Mackey K. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques* 1995; **19**(6):942-945.
144. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time

- quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**(4):402-408.
145. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**:248-254.
146. Wang R, Dworak LJ, Lacy MJ. A panel immunoblot using co-incubated monoclonal antibodies for identification of melanoma cells. *J Immunol Methods* 2001; **249**(1-2):167-183.
147. Gaillard C, Strauss F. Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**(2):378.
148. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 2011; **17**(1):10-12.
149. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 2009; **10**(3):R25.
150. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004; **5**(10):R80.
151. Liao Y, Smyth GK, Shi W. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 2014; **30**(7):923-930.
152. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010; **26**(1):139-140.
153. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014; **42**(Database issue):D68-73.
154. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res* 2015; **43**(W1):W566-570.
155. Wilkerson EM, Johansson MW, Hebert AS, Westphall MS, Mathur SK, Jarjour NN, Schwantes EA, Mosher DF, Coon JJ. The Peripheral Blood Eosinophil Proteome. *J Proteome Res* 2016; **15**(5):1524-1533.
156. Woschnagg C, Forsberg J, Engström Å, Odreman F, Venge P, Garcia RC. The Human Eosinophil Proteome. Changes Induced by Birch Pollen Allergy. *J Proteome Res* 2009; **8**(6):2720-2732.

Bibliografía

157. Cortegano I, del Pozo V, Cárđaba B, de Andrés B, Gallardo S, del Amo A, Arrieta I, Jurado A, Palomino P, Liu FT, Lahoz C. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. *J Immunol* 1998; **161**(1):385-389.
158. Zon LI, Yamaguchi Y, Yee K, Albee EA, Kimura A, Bennett JC, Orkin SH, Ackerman SJ. Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood* 1993; **81**(12):3234-3241.
159. Bettiol J, Bartsch P, Louis R, De Groote D, Gevaerts Y, Louis E, Malaise M. Cytokine production from peripheral whole blood in atopic and nonatopic asthmatics: relationship with blood and sputum eosinophilia and serum IgE levels. *Allergy* 2000; **55**(12):1134-1141.
160. Xia YC, Harris T, Stewart AG, Mackay GA. Secreted factors from human mast cells trigger inflammatory cytokine production by human airway smooth muscle cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; **160**(1):75-85.
161. Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G, Hivroz C. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol* 2002; **168**(7):3235-3241.
162. Esser J, Gehrman U, D'Alexandri FL, Hidalgo-Estévez AM, Wheelock CE, Scheynius A, Gabrielsson S, Rådmark O. Exosomes from human macrophages and dendritic cells contain enzymes for leukotriene biosynthesis and promote granulocyte migration. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **126**(5):1032-1040,1040.e1-4.
163. Vallhov H, Gutzeit C, Hultenby K, Valenta R, Grönlund H, Scheynius A. Dendritic cell-derived exosomes carry the major cat allergen Fel d 1 and induce an allergic immune response. *Allergy* 2015; **70**(12):1651-1655.
164. Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; **105**(4):651-663.
165. Melo RC, Weller PF. Unraveling the complexity of lipid body organelles in human eosinophils. *J Leukoc Biol* 2014; **96**(5):703-712.
166. Matsuo H, Chevallier J, Mayran N, Le Blanc I, Ferguson C, Fauré J, Blanc NS, Matile S, Dubochet J, Sadoul R, Parton RG, Vilbois F, Gruenberg J. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 2004; **303**(5657):531-534.
167. Fukuda M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular

- trafficking. *J Biol Chem* 1991; **266**(32):21327-21330.
168. Kobayashi T, Vischer UM, Rosnoblet C, Lebrand C, Lindsay M, Parton RG, Kruithof EK, Gruenberg J. The tetraspanin CD63/lamp3 cycles between endocytic and secretory compartments in human endothelial cells. *Mol Biol Cell* 2000; **11**(5):1829-1843.
169. Moqbel R, Lacy P. Exocytotic events in eosinophils and mast cells. *Clin Exp Allergy* 1999; **29**(8):1017-1022.
170. Egesten A, Calafat J, Janssen H, Knol EF, Malm J, Persson T. Granules of human eosinophilic leucocytes and their mobilization. *Clin Exp Allergy* 2001; **31**(8):1173-1188.
171. Neves JS, Weller PF. Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology. *Curr Opin Immunol* 2009; **21**(6):694-699.
172. Melo RC, Liu L, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophil-derived cytokines in health and disease: unraveling novel mechanisms of selective secretion. *Allergy* 2013; **68**(3):274-284.
173. Sanderson MP, Keller S, Alonso A, Riedle S, Dempsey PJ, Altevogt P. Generation of novel, secreted epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1) isoforms via metalloprotease-dependent ectodomain shedding and exosome secretion. *J Cell Biochem* 2008; **103**(6):1783-1797.
174. Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol* 2003; **111**(5):923-932.
175. Park JA, Sharif AS, Tschumperlin DJ, Lau L, Limbrey R, Howarth P, Drazen JM. Tissue factor-bearing exosome secretion from human mechanically stimulated bronchial epithelial cells in vitro and in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **130**(6):1375-1383.
176. Alonso R, Mazzeo C, Rodriguez MC, Marsh M, Fraile-Ramos A, Calvo V, Avila-Flores A, Merida I, Izquierdo M. Diacylglycerol kinase α regulates the formation and polarisation of mature multivesicular bodies involved in the secretion of Fas ligand-containing exosomes in T lymphocytes. *Cell Death Differ* 2011; **18**(7):1161-1173.
177. Dvorak AM, Saito H, Estrella P, Kissell S, Arai N, Ishizaka T. Ultrastructure of eosinophils and basophils stimulated to develop in human cord blood mononuclear cell cultures containing recombinant human interleukin-5 or interleukin-3. *Lab Invest* 1989; **61**(1):116-132.

Bibliografia

178. Mazzeo C, Calvo V, Alonso R, Mérida I, Izquierdo M. Protein kinase D1/2 is involved in the maturation of multivesicular bodies and secretion of exosomes in T and B lymphocytes. *Cell Death Differ* 2016; **23**(1):99-109.
179. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, Samuel M, Pathan M, Jois M, Chilamkurti N, Gangoda L, Mathivanan S. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol* 2016; **428**(4):688-692.
180. Willms E, Johansson HJ, Mäger I, Lee Y, Blomberg KE, Sadik M, Alaarg A, Smith CI, Lehtio J, El Andaloussi S, Wood MJ, Vader P. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep* 2016; **6**:22519.
181. Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2014; **29**:116-125.
182. Neves JS, Perez SA, Spencer LA, Melo RC, Reynolds L, Ghiran I, Mahmudi-Azer S, Odemuyiwa SO, Dvorak AM, Moqbel R, Weller PF. Eosinophil granules function extracellularly as receptor-mediated secretory organelles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**(47):18478-18483.
183. Gercel-Taylor C, Atay S, Tullis RH, Kesimer M, Taylor DD. Nanoparticle analysis of circulating cell-derived vesicles in ovarian cancer patients. *Anal Biochem* 2012; **428**(1):44-53.
184. McBrien CN, Menzies-Gow A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Front Med* 2017; **4**:93.
185. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJ, Hole P, Carr B, Redman CW, Harris AL, Dobson PJ, Harrison P, Sargent IL. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine* 2011; **7**(6):780-788.
186. Ludwig AK, Giebel B. Exosomes: Small vesicles participating in intercellular communication. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; **44**(1):11-15.
187. Ventimiglia LN, Alonso MA. Biogenesis and Function of T Cell-Derived Exosomes. *Front Cell Dev Biol* 2016; **4**:84.
188. Admyre C, Telemo E, Almqvist N, Lötvall J, Lahesmaa R, Scheynius A, Gabrielsson S. Exosomes - nanovesicles with possible roles in allergic inflammation. *Allergy* 2008; **63**(4):404-408.
189. Almqvist N, Lönnqvist A, Hultkrantz S, Rask C, Telemo E. Serum-derived exosomes from

- antigen-fed mice prevent allergic sensitization in a model of allergic asthma. *Immunology* 2008; **125**(1):21-27.
190. Haj-Salem I, Plante S, Gounni AS, Rouabhia M, Chakir J. Fibroblast-derived exosomes promote epithelial cell proliferation through TGF- β 2 signalling pathway in severe asthma. *Allergy* 2018; **73**(1):178-186.
 191. Lukic A, Ji J, Idborg H, Samuelsson B, Palmberg L, Gabrielsson S, Rådmark O. Pulmonary epithelial cancer cells and their exosomes metabolize myeloid cell-derived leukotriene C4 to leukotriene D4. *J Lipid Res* 2016; **57**(9):1659-1669.
 192. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; **326**(5):298-304.
 193. Frigas E, Gleich GJ. The eosinophil and the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986; **77**(4):527-537.
 194. Kankaanranta H, Lindsay MA, Giembycz MA, Zhang X, Moilanen E, Barnes PJ. Delayed eosinophil apoptosis in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; **106**(1 Pt 1):77-83.
 195. Shen ZJ, Malter JS. Determinants of eosinophil survival and apoptotic cell death. *Apoptosis* 2015; **20**(2):224-234.
 196. Ghosh S, Hoselton SA, Dorsam GP, Schuh JM. Eosinophils in fungus-associated allergic pulmonary disease. *Front Pharmacol* 2013; **4**:8.
 197. Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* 2001; **193**(2):255-261.
 198. Tager AM, Dufour JH, Goodarzi K, Bercury SD, von Andrian UH, Luster AD. BLTR mediates leukotriene B(4)-induced chemotaxis and adhesion and plays a dominant role in eosinophil accumulation in a murine model of peritonitis. *J Exp Med* 2000; **192**(3):439-446.
 199. Czech W, Krutmann J, Budnik A, Schöpf E, Kapp A. Induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression in normal human eosinophils by inflammatory cytokines. *J Invest Dermatol* 1993; **100**(4):417-423.
 200. Jia GQ, Gonzalo JA, Hidalgo A, Wagner D, Cybulsky M, Gutierrez-Ramos JC. Selective

- eosinophil transendothelial migration triggered by eotaxin via modulation of Mac-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 interactions. *Int Immunol* 1999; **11**(1):1-10.
201. Pretolani M, Ruffié C, Lapa e Silva JR, Joseph D, Lobb RR, Vargaftig BB. Antibody to very late activation antigen 4 prevents antigen-induced bronchial hyperreactivity and cellular infiltration in the guinea pig airways. *J Exp Med* 1994; **180**(3):795-805.
 202. Giancotti FG, Tarone G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; **19**:173-206.
 203. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; **285**(5430):1028-1032.
 204. Shahabuddin S, Ponath P, Schleimer RP. Migration of eosinophils across endothelial cell monolayers: interactions among IL-5, endothelial-activating cytokines, and C-C chemokines. *J Immunol* 2000; **164**(7):3847-3854.
 205. Xie Y, Zhang H, Li W, Deng Y, Munegowda MA, Chibbar R, Qureshi M, Xiang J. Dendritic cells recruit T cell exosomes via exosomal LFA-1 leading to inhibition of CD8+ CTL responses through downregulation of peptide/MHC class I and Fas ligand-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 2010; **185**(9):5268-5278.
 206. Segura E, Guérin C, Hogg N, Amigorena S, Théry C. CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J Immunol* 2007; **179**(3):1489-1496.
 207. Vargas A, Roux-Dalvai F, Droit A, Lavoie JP. Neutrophil-Derived Exosomes: A New Mechanism Contributing to Airway Smooth Muscle Remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016; **55**(3):450-461.
 208. Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nagata K, Yoshimura A. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001; **108**(12):1781-1788.
 209. Liu X, Qu X, Chen Y, Liao L, Cheng K, Shao C, Zenke M, Keating A, Zhao RC. Mesenchymal stem/stromal cells induce the generation of novel IL-10-dependent regulatory dendritic cells by SOCS3 activation. *J Immunol* 2012; **189**(3):1182-1192.
 210. Leslie JD, Mayor R. Complement in animal development: unexpected roles of a highly conserved pathway. *Semin Immunol* 2013; **25**(1):39-46.

211. Yang D, Rosenberg HF, Chen Q, Dyer KD, Kurosaka K, Oppenheim JJ. Eosinophil-derived neurotoxin (EDN), an antimicrobial protein with chemotactic activities for dendritic cells. *Blood* 2003; **102**(9):3396-3403.
212. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol.* 2003; **170**(6):3233-3242.
213. Pope SM, Zimmermann N, Stringer KF, Karow ML, Rothenberg ME. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. *J Immunol* 2005; **175**(8):5341-5350.
214. Rankin SM, Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Mol Med Today* 2000; **6**(1):20-27.
215. Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, Kubo M, Yamashita A, Okabe M, Takeda K, Akira S, Matsumoto S, Toyonaga A, Sata M, Yoshimura A. CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp Med* 2001; **193**(4):471-481.
216. Sahiner UM, Birben E, Erzurum S, Sackesen C, Kalayci O. Oxidative Stress in Asthma. *World Allergy Organ J* 2011; **4**(10):151-158.
217. Mak JC, Chan-Yeung MM. Reactive oxidant species in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2006; **12**(1):7-11.
218. Bowler RP. Oxidative stress in the pathogenesis of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004; **4**(2):116-122.
219. Henricks PA, Nijkamp FP. Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2001; **14**(6):409-420.
220. Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radic Biol Med* 1990; **9**(3):235-243.
221. Dworski R. Oxidant stress in asthma. *Thorax* 2000; **55** Suppl 2:S51-53.
222. Reddel HK, Bateman ED, Becker A, Boulet LP, Cruz AA, Drazen JM, Haahtela T, Hurd SS, Inoue H, de Jongste JC, Lemanske RF Jr, Levy ML, O'Byrne PM, Paggiaro P, Pedersen SE, Pizzichini E, Soto-Quiroz M, Szeffler SJ, Wong GW, FitzGerald JM. A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. *Eur Respir J* 2015; **46**(3):622-639.

Bibliografia

223. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **161**(5):1720-1745.
224. Hirst SJ. Regulation of airway smooth muscle cell immunomodulatory function: role in asthma. *Respir Physiol Neurobiol* 2003; **137**(2-3):309-326.
225. Chung KF. Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation?. *Eur Respir J* 2000; **15**(5):961-968.
226. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 2014; **3**:24641.
227. Johansson MW. Activation states of blood eosinophils in asthma. *Clin Exp Allergy* 2014; **44**(4):482-498.
228. Oddera S, Silvestri M, Balbo A, Jovovich BO, Penna R, Crimi E, Rossi GA. Airway eosinophilic inflammation, epithelial damage, and bronchial hyperresponsiveness in patients with mild-moderate, stable asthma. *Allergy* 1996; **51**(2):100-107.
229. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011; **128**(3):451-462.
230. Parulekar AD, Atik MA, Hanania NA. Periostin, a novel biomarker of TH2-driven asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2014; **20**(1):60-65.
231. Coleman JM, Naik C, Holguin F, Ray A, Ray P, Trudeau JB, Wenzel SE. Epithelial eotaxin-2 and eotaxin-3 expression: relation to asthma severity, luminal eosinophilia and age at onset. *Thorax* 2012; **67**(12):1061-1066.
232. Sidhu SS, Yuan S, Innes AL, Kerr S, Woodruff PG, Hou L, Muller SJ, Fahy JV. Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF-beta activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**(32):14170-14175.
233. Larose MC, Chakir J, Archambault AS, Joubert P, Provost V, Laviolette M, Flamand N. Correlation between CCL26 production by human bronchial epithelial cells and airway eosinophils: Involvement in patients with severe eosinophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; **136**(4):904-913.
234. Gillan L, Matei D, Fishman DA, Gerbin CS, Karlan BY, Chang DD. Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins

- and promotes cell motility. *Cancer Res* 2002; **62**(18):5358-5364.
235. Takayama G, Arima K, Kanaji T, Toda S, Tanaka H, Shoji S, McKenzie AN, Nagai H, Hotokebuchi T, Izuhara K. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol* 2006; **118**(1):98-104.
 236. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNF α in pulmonary pathophysiology. *Respir Res* 2006; **7**:125.
 237. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**(9):745-756.
 238. Suzuki J, Hamada E, Shodai T, Kamoshida G, Kudo S, Itoh S, Koike J, Nagata K, Irimura T, Tsuji T. Cytokine secretion from human monocytes potentiated by P-selectin-mediated cell adhesion. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; **160**(2):152-160.
 239. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 2012; **119**(3):651-665.
 240. Rivas-Santiago BT, Torres M, Bobadilla K, Sada E. Papel de las células epiteliales en la respuesta inmune del pulmón. *REV INST NAL ENF RESP MEX* 2005; **18**(4):321-326.
 241. Malaviya R, Laskin JD, Laskin DL. Anti-TNF α therapy in inflammatory lung diseases. *Pharmacol Ther* 2017; **180**:90-98.
 242. Medina-Tato DA, Ward SG, Watson ML. Phosphoinositide 3-kinase signalling in lung disease: leucocytes and beyond. *Immunology* 2007; **121**(4):448-461.
 243. Bujak A, Nejman-Gryz P, Gunerka P, Lamparska-Przybysz M, Wiecezorek M, Chazan R, Stanczak A. Inhibition of JAK/STAT pathway in airway epithelium as a potential targeted therapy of asthma. *Eur Respir J* 2014; **44** Suppl 58:3413.
 244. Wang WC, Kuo CY, Tzang BS, Chen HM, Kao SH. IL-6 augmented motility of airway epithelial cell BEAS-2B via Akt/GSK-3 β signaling pathway. *J Cell Biochem* 2012; **113**(11):3567-3575.
 245. Kida H, Mucenski ML, Thitoff AR, Le Cras TD, Park KS, Ikegami M, Müller W, Whitsett JA. GP130-STAT3 regulates epithelial cell migration and is required for repair of the bronchiolar epithelium. *Am J Pathol* 2008; **172**(6):1542-1554.
 246. Matsuzaki Y, Xu Y, Ikegami M, Besnard V, Park KS, Hull WM, Wert SE, Whitsett JA.

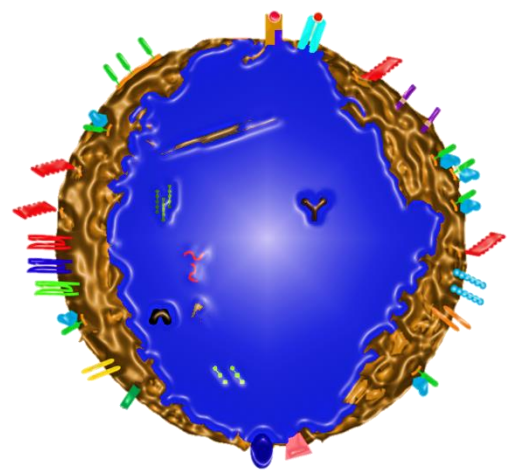
Bibliografia

- Stat3 is required for cytoprotection of the respiratory epithelium during adenoviral infection. *J Immunol* 2006; **177**(1):527-537.
247. Tadokoro T, Wang Y, Barak LS, Bai Y, Randell SH, Hogan BL. IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**(35):E3641-3649.
248. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005; **9**(1):59-71.
249. Johnson PR, Roth M, Tamm M, Hughes M, Ge Q, King G, Burgess JK, Black JL. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **164**(3):474-477.
250. Redhu NS, Shan L, Al-Subait D, Ashdown HL, Movassagh H, Lamkhioed B, Gounni AS. IgE induces proliferation in human airway smooth muscle cells: role of MAPK and STAT3 pathways. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2013; **9**(1):41.
251. Zhou L, Hershenson MB. Mitogenic signaling pathways in airway smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol* 2003; **137**(2-3):295-308.
252. Lee JH, Johnson PR, Roth M, Hunt NH, Black JL. ERK activation and mitogenesis in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; **280**(5):L1019-1029.
253. Burgess JK, Lee JH, Ge Q, Ramsay EE, Poniris MH, Parmentier J, Roth M, Johnson PR, Hunt NH, Black JL, Ammit AJ. Dual ERK and phosphatidylinositol 3-kinase pathways control airway smooth muscle proliferation: differences in asthma. *J Cell Physiol* 2008; **216**(3):673-679.
254. Errahali YJ, Taka E, Abonyo BO, Heiman AS. CCL26-targeted siRNA treatment of alveolar type II cells decreases expression of CCR3-binding chemokines and reduces eosinophil migration: implications in asthma therapy. *J Interferon Cytokine Res* 2009; **29**(4):227-239.
255. Halwani R, Al-Abri J, Beland M, Al-Jahdali H, Halayko AJ, Lee TH, Al-Muhsen S, Hamid Q. CC and CXC chemokines induce airway smooth muscle proliferation and survival. *J Immunol* 2011; **186**(7):4156-4163.
256. Markwick LJ, Clements D, Roberts ME, Ceresa CC, Knox AJ, Johnson SR. CCR3 induced-p42/44 MAPK activation protects against staurosporine induced-DNA fragmentation but

- not apoptosis in airway smooth muscle cells. *Clin Exp Allergy* 2012; **42**(7):1040-1050.
257. Chetta A, Zanini A, Foresi A, D'Ippolito R, Tipa A, Castagnaro A, Baraldo S, Neri M, Saetta M, Olivieri D. Vascular endothelial growth factor up-regulation and bronchial wall remodelling in asthma. *Clin Exp Allergy* 2005; **35**(11):1437-1442.
 258. Shaheen SO, Adcock IM. The developmental origins of asthma: does epigenetics hold the key?. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; **180**(8):690-691.
 259. Barnes PJ. Targeting the epigenome in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2009; **6**(8):693-696.
 260. Perry MM, Baker JE, Gibeon DS, Adcock IM, Chung KF. Airway smooth muscle hyperproliferation is regulated by microRNA-221 in severe asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014; **50**(1):7-17.
 261. Kho AT, Sharma S, Davis JS, Spina J, Howard D, McEnroy K, Moore K, Sylvia J, Qiu W, Weiss ST, Tantisira KG. Circulating MicroRNAs: Association with Lung Function in Asthma. *PLoS One* 2016; **11**(6):e0157998.
 262. Panganiban RP, Wang Y, Howrylak J, Chinchilli VM, Craig TJ, August A, Ishmael FT. Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **137**(5):1423-1432.
 263. Maes T, Cobos FA, Schleich F, Sorbello V, Henket M, De Preter K, Bracke KR, Conickx G, Mesnil C, Vandesompele J, Lahousse L, Bureau F, Mestdagh P, Joos GF, Ricciardolo FL, Brusselle GG, Louis R. Asthma inflammatory phenotypes show differential microRNA expression in sputum. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **137**(5):1433-1446.
 264. Cushing L, Jiang Z, Kuang P, Lü J. The roles of microRNAs and protein components of the microRNA pathway in lung development and diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015; **52**(4):397-408.
 265. Lee HY, Lee HY, Choi JY, Hur J, Kim IK, Kim YK, Kang JY, Lee SY. Inhibition of MicroRNA-21 by an antagomir ameliorates allergic inflammation in a mouse model of asthma. *Exp Lung Res* 2017; **43**(3):109-119.
 266. Brown D, Rahman M, Nana-Sinkam SP. MicroRNAs in respiratory disease. A clinician's overview. *Ann Am Thorac Soc* 2014; **11**(8):1277-1285.
 267. Heffler E, Allegra A, Pioggia G, Picardi G, Musolino C, Gangemi S. MicroRNA Profiling

Bibliografia

- in Asthma: Potential Biomarkers and Therapeutic Targets. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2017; **57**(6):642-650.
268. Munitz A, Karo-Atar D, Foster PS. Asthma diagnosis: MicroRNAs to the rescue. *J Allergy Clin Immunol* 2016; **137**(5):1447-1448.
269. O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 2012; **30**:295-312.
270. Dai R, Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res* 2011; **157**(4):163-179.
271. Jia G, Erickson RW, Choy DF, Mosesova S, Wu LC, Solberg OD, Shikotra A, Carter R, Audousseau S, Hamid Q, Bradding P, Fahy JV, Woodruff PG, Harris JM, Arron JR; Bronchoscopic Exploratory Research Study of Biomarkers in Corticosteroid-refractory Asthma (BOBCAT) Study Group. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **130**(3):647-654.e10.
272. Wang Y, Chen J, Lin Z, Cao J, Huang H, Jiang Y, He H, Yang L, Ren N, Liu G. Role of deregulated microRNAs in non-small cell lung cancer progression using fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded samples. *Oncol Lett* 2016; **11**(1):801-808.
273. Regev K, Paul A, Healy B, von Glenn F, Diaz-Cruz C, Gholipour T, Mazzola MA, Raheja R, Nejad P, Glanz BI, Kivisakk P, Chitnis T, Weiner HL, Gandhi R. Comprehensive evaluation of serum microRNAs as biomarkers in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2016; **3**(5):e267.



ANEXO I

Número de acceso	Nombre de la proteína	Exosomas de asmáticos		Exosomas de sanos		Longitud de la secuencia (AAs)	Peso molecular (kDa)	pI teórico
		Cobertura de secuencia (%)	Péptidos coincidentes	Cobertura de secuencia (%)	Péptidos coincidentes			
P31997	Antígeno CD66b o CD67	7,27	2			344	37,50	7,77
F8W696	Apolipoproteína A-I	11,43	2			245	27,89	6,13
P05090	Apolipoproteína D	8,99	2			189	21,26	5,15
P20930	Filagrina	4,16	5			4061	434,92	9,25
P02763	Glicoproteína ácida 1 alfa-1	21,89	4			201	23,50	5,02
E9PNW4	Glicoproteína CD59	29,63	3			108	11,98	5,74
C9JEV0	Glicoproteína zinc-alfa-2	18,06	3			227	26,34	5,73
B4DJC3	Histona H2A	13,00	2			200	21,53	9,74
P01859	Inmunoglobulina pesada constante gamma 2	7,36	2			326	35,88	7,59
P29508-2	Isoforma 2 de la serpin B3	10,06	3			338	38,53	6,74
P10599-2	Isoforma 2 de la tioredoxina	25,88	2			85	9,45	6,04
Q14574-2	Isoforma 3B de la desmocolina-3	3,46	2			839	93,40	6,32
Q8TDL5	Miembro 1 de la familia B con plegamiento BPI	12,60	5			484	52,41	7,23
P32119	Peroxirredoxina-2	18,69	4			198	21,88	5,97
P00747	Plasminógeno	2,96	2			810	90,51	7,24
B9A064	Polipéptido similar a la inmunoglobulina lambda 5	17,76	3			214	23,05	8,84
P01833	Receptor polimérico de la inmunoglobulina	2,36	2			764	83,23	5,74
F5H265	Poliubiquitina-C	45,64	3			149	16,83	6,58
D6RBJ7	Proteína de unión a la vitamina D	4,60	2			348	38,77	5,50
P62826	Proteína nuclear Ran de unión a GTP	14,81	3			216	24,41	7,49
H3BMH2	Proteína Rab-11A relacionada con Ras	21,29	3			155	17,66	8,34
P01834	Región C de la cadena kappa de la inmunoglobulina	33,02	2			106	11,60	5,87
O15144	Subunidad 2 del complejo proteico 2/3 relacionado con actina	11,00	3			300	34,31	7,36

Anexo I

Número de acceso	Nombre de la proteína	Exosomas de asmáticos		Exosomas de sanos		Longitud de la secuencia (AAs)	Peso molecular (kDa)	pI teórico
		Cobertura de secuencia (%)	Péptidos coincidentes	Cobertura de secuencia (%)	Péptidos coincidentes			
P37802	Transgelina-2	13,07	2			199	22,38	8,25
A0A0C4DGN4	Zimógeno del homólogo B de la proteína granular 16	12,92	3			178	19,59	5,95
P18465	Antígeno de histocompatibilidad HLA clase I, cadena alfa B-57			8,29	2	362	40,20	6,30
P27797	Calreticulina			6,95	2	417	48,11	4,44
Q5HY54	Filamina-A			1,88	3	2607	276,38	6,05
K7EQ48	Glucosa-6-fosfato isomerasa			9,07	3	474	53,37	8,68
P20073-2	Isoforma 2 de la anexina A7			7,51	3	466	50,28	6,61
P00390-5	Isoforma 4 de la glutatión reductasa, mitocondrial			5,23	2	440	47,24	8,75
P14780	Metaloproteinasa-9 de matriz			25,88	15	707	78,41	6,06
P49913	Péptido antimicrobiano catelicidina			17,65	3	170	19,29	9,41
P17213	Proteína bactericida que aumenta la permeabilidad (CAP 57)			4,11	2	487	53,87	9,38
Q04917	Proteína eta 14-3-3			8,94	2	246	28,20	4,84
H0YMN7	Proteína Rab-8 relacionada con Ras			23,91	2	92	10,48	9,33
P61586	Proteína transformante RhoA			10,88	2	193	21,75	6,10
P68032	Actina alfa 1, músculo cardíaco	25,20	9	23,08	8	377	41,99	5,39
H9KV75	Actinina alfa-1	3,65	3	16,30	11	822	94,77	5,69
P06733	Alfa enolasa	20,51	7	18,43	6	434	47,14	7,39
P04083	Anexina A1	34,10	12	47,40	15	346	38,69	7,02
P08758	Anexina A5	35,31	11	19,69	5	320	35,91	5,05
P01008	Anti-trombina (serpin C1)	4,31	2	6,90	3	464	52,57	6,71
P16050	Araquidonato 15-lipoxigenasa	11,78	6	11,93	7	662	74,76	6,58
P55072	ATPasa del retículo endoplásmico transitorio	23,57	15	23,82	15	806	89,27	5,26
P60709	Beta-actina	28,53	10	29,87	10	375	41,71	5,48

Número de acceso	Nombre de la proteína	Exosomas de asmáticos		Exosomas de sanos		Longitud de la secuencia (AAs)	Peso molecular (kDa)	pI teórico
		Cobertura de secuencia (%)	Péptidos coincidentes	Cobertura de secuencia (%)	Péptidos coincidentes			
P00338	Cadena A de la L-lactato deshidrogenasa	6,63	2	11,14	3	332	36,67	8,27
P68363	Cadena alfa-1B de la tubulina	19,96	7	16,63	6	451	50,12	5,06
P19105	Cadena ligera reguladora 12A de la miosina	12,28	2	18,13	3	171	19,78	4,81
P01876	Cadena pesada constante alfa 1de la inmunoglobulina	20,40	6	5,38	2	353	37,63	6,51
Q5T985	Cadena pesada H2 del inhibidor de la alfa-tripsina	4,81	4	3,96	3	935	105,15	7,03
P04040	Catalasa	19,35	8	25,05	11	527	59,72	7,39
P08311	Catepsina G	15,69	3	18,82	4	255	28,82	11,19
P00450	Ceruloplasmina (ferroxidasa)	3,10	3	3,85	4	1065	122,13	5,72
G3V1A4	Cofilina 1, isoforma CRA_a	16,78	2	16,78	2	149	16,80	8,35
P31146	Coronina-1A	15,40	6	13,88	7	461	50,99	6,68
P02765	Fetúina-A	7,08	4	5,45	3	367	39,30	5,72
H3BQN4	Fructosa-bisfosfato aldolasa	6,37	2	7,20	2	361	39,32	8,40
P04406	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	28,06	7	25,37	6	335	36,03	8,46
P11413	Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	9,32	3	10,29	4	515	59,22	6,84
P16403	Histona H1.2	11,27	3	15,96	5	213	21,35	10,93
P04908	Histona H2A tipo 1-B/E	35,38	5	35,38	4	130	14,13	11,05
P0C0S5	Histona H2A.Z	20,31	3	31,25	4	128	13,54	10,58
O60814	Histona H2B tipo 1-K	43,65	7	30,95	4	126	13,88	10,32
K7EK07	Histona H3	13,64	2	25,00	3	132	14,91	11,30
P62805	Histona H4	53,40	10	53,40	10	103	11,36	11,36
F5H2R5	Inhibidor 2 de la disociación Rho GDP	23,86	2	23,86	2	88	9,79	4,59
P11215	Integrina alfa-M (CD11b)	24,31	23	15,54	15	1152	127,10	7,23
P05107	Integrina beta-2 (CD18)	18,99	12	10,79	7	769	84,73	6,95
P02751-12	Isoforma 12 de la fibronectina	2,69	4	3,14	5	2008	221,15	6,18

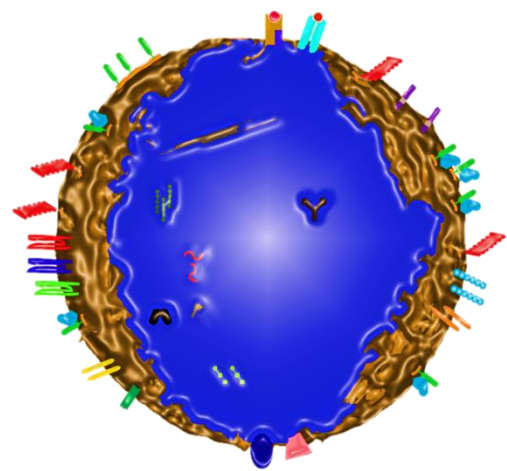
Anexo I

Número de acceso	Nombre de la proteína	Exosomas de asmáticos		Exosomas de sanos		Longitud de la secuencia (AAs)	Peso molecular (kDa)	pI teórico
		Cobertura de secuencia (%)	Péptidos coincidentes	Cobertura de secuencia (%)	Péptidos coincidentes			
P52209-2	Isoforma 2 de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, descarboxilada	14,68	6	10,64	4	470	51,84	7,44
P06396-2	Isoforma 2 de la gelsolina	17,51	10	18,47	10	731	80,59	5,85
Q01518-2	Isoforma 2 de la proteína 1 asociada a la adenilil ciclasa	11,60	4	8,23	3	474	51,80	8,06
P0DMV8-2	Isoforma 2 de la proteína de choque térmico de 70 kDa 1A/1B	13,99	6	19,28	9	586	63,90	5,71
P61224-3	Isoforma 3 de la proteína Rap-1b relacionada con Ras	26,67	5	43,03	8	165	18,77	8,53
F8WE65	Isomerasa peptidil-prolil cis-trans	21,67	3	29,17	4	120	13,01	6,77
F8VV32	Lisozima	37,50	4	23,08	2	104	11,48	9,07
P35579	Miosina-9	7,60	12	7,76	12	1960	226,39	5,60
P26038	Moesina	4,51	3	6,41	4	577	67,78	6,40
P10153	Neurotoxina derivada del eosinófilo	9,32	2	9,32	2	161	18,34	8,73
Q15063	Periostina	7,66	5	2,27	2	836	93,26	7,53
P11678	Peroxidasa del eosinófilo	33,01	27	32,45	27	715	80,99	10,29
P14618	Piruvato quinasa PKM	24,29	10	29,00	12	531	57,90	7,84
P07737	Profilina-1	47,14	5	37,14	4	140	15,04	8,27
P63104	Proteína 14-3-3 zeta/delta	10,61	2	10,61	2	245	27,73	4,79
P13727	Proteína mayor básica	31,08	5	23,87	4	222	25,19	6,76
P12724	Proteína catiónica del eosinófilo	32,50	5	38,75	6	160	18,37	10,02
O00299	Proteína del canal de cloro intracelular 1	21,16	4	21,16	4	241	26,91	5,17
P01024	Proteína del complemento C3	2,53	5	2,41	5	1663	187,03	6,40
H7BZ94	Proteína disulfuro-isomerasa	7,54	3	7,76	3	464	52,47	4,87
P12273	Proteína inducible por prolactina	28,08	3	21,23	2	146	16,56	8,05
P11021	Proteína regulada por glucosa de 78 kDa	6,42	3	5,66	3	654	72,29	5,16
P05109	Proteína S100-A8	40,86	5	59,14	10	93	10,83	7,03

Número de acceso	Nombre de la proteína	Exosomas de asmáticos		Exosomas de sanos		Longitud de la secuencia (AAs)	Peso molecular (kDa)	pI teórico
		Cobertura de secuencia (%)	Péptidos coincidentes	Cobertura de secuencia (%)	Péptidos coincidentes			
P06702	Proteína S100-A9	48,25	6	66,67	8	114	13,23	6,13
E9PIT3	Protrombina	5,49	3	6,86	4	583	65,37	5,71
Q96P63	Serpin B12	5,93	2	5,93	2	405	46,25	5,53
P36955	Serpin F1	9,33	4	9,33	4	418	46,28	6,38
P52907	Subunidad alfa-1 de la proteína F-actina capsular	13,99	3	8,74	2	286	32,90	5,69
P04899	Subunidad alfa-2 de la proteína G (i) de unión a nucleótidos de la guanina	18,03	5	26,48	7	355	40,43	5,54
Q6DRA6	Supuesta histona H2B tipo 2-D	15,24	2	15,24	2	164	18,01	10,58
B1AH77	Sustrato 2 de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras	22,30	4	19,59	3	148	16,76	8,06
Q9Y490	Talina-1	0,87	2	1,97	4	2541	269,60	6,07
F2Z393	Transaldolasa	17,61	5	10,69	3	318	35,31	8,97
P29401	Transcetolasa	9,47	5	4,98	2	623	67,83	7,66
B0YJC4	Vimentina	3,94	2	10,90	5	431	49,62	5,25

Tabla 9. Proteínas descritas en exosomas procedentes de eosinófilos de sujetos sanos y de pacientes asmáticos mediante espectrometría de masas. AAs, aminoácidos; kDa, kilodalton; pI, punto isoelectrico.

- Proteínas detectadas en exosomas procedentes de eosinófilos de pacientes asmáticos
- Proteínas detectadas en exosomas procedentes de eosinófilos de sujetos sanos
- Proteínas detectadas en exosomas procedentes de eosinófilos de pacientes asmáticos y de sujetos sanos



ANEXO II

PUBLICACIONES A LAS QUE HA DADO LUGAR ESTA TESIS

- Mazzeo C, **Cañas JA**, Zafra MP, Rojas Marco A, Fernández-Nieto M, Sanz V, Mittelbrunn M, Izquierdo M, Baixauli F, Sastre J, Del Pozo V. Exosome secretion by eosinophils: A possible role in asthma pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **135**(6):1603-1613. doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.026.
- **Cañas JA**, Sastre B, Mazzeo C, Fernández-Nieto M, Rodrigo-Muñoz JM, González-Guerra A, Izquierdo M, Barranco P, Quirce S, Sastre J, Del Pozo V. Exosomes from eosinophils autoregulate and promote eosinophil functions. *J Leukoc Biol* 2017; **101**(5):1191-1199. doi: 10.1189/jlb.3AB0516-233RR.
- **Cañas JA**, Sastre B, Rodrigo-Muñoz J, Fernandez-Nieto M, Barranco P, Quirce S, Sastre J, Del Pozo V. Eosinophil-derived exosomes contribute to asthma remodelling by activating structural lung cells. *Clin Exp Allergy* 2018. *En prensa*. doi: 10.1111/cea.13122.

ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

- Zafra MP, **Cañas JA**, Mazzeo C, Gámez C, Sanz V, Fernández-Nieto M, Quirce S, Barranco P, Ruiz-Hornillos J, Sastre J, del Pozo V. SOCS3 silencing attenuates eosinophil functions in asthma patients. *Int J Mol Sci* 2015; **16**(3):5434-5451. doi: 10.3390/ijms16035434.
- García-García ML, Calvo C, Moreira A, **Cañas JA**, Pozo F, Sastre B, Quevedo S, Casas I, Del Pozo V. Thymic stromal lymphopoietin, IL-33, and periostin in hospitalized infants with viral bronchiolitis. *Medicine (Baltimore)* 2017; **96**(18):e6787. doi: 10.1097/MD.0000000000006787.
- Sastre B, **Cañas JA**, Rodrigo-Muñoz JM, Del Pozo V. Novel Modulators of Asthma and Allergy: Exosomes and MicroRNAs. *Front Immunol* 2017; **8**:826. doi: 10.3389/fimmu.2017.00826.
- Muñoz X, Alvarez-Puebla MJ, Arismendi E, Arochena L, Ausin MP, Barranco P, Bobolea I, **Cañas JA**, Cárdbaba B, Crespo A, del Pozo V, Domínguez J, Fernández-Nieto M, Giner J, González-Barcala FJ, Luna JA, Mullol J, Ojanguren I, Olaguibel JM, Picado C, Plaza V, Quirce S, Ramos D, Rial M, Romero-Mesones C, Salgado FJ, Sanjose ME, Sánchez-Diez S, Sastre J, Sastre B, Soto L, Torrejón M, Urdanoz-Erro M, Valdés L, Valero A, Cruz MJ. Estudio de los mecanismos implicados en la génesis y evolución del asma (Proyecto MEGA): Creación y seguimiento a largo plazo de una cohorte de pacientes asmáticos. *Arch Bronconeumol* 2017. *En prensa*. doi: 10.1016/j.arbres.2017.12.012.
- **Cañas JA**, Rodrigo-Muñoz JM, Rondon-Cepeda SH, Bordehore C, Fernández-Nieto M, Del Pozo V. Jellyfish collagen: a new allergen in the beach. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2018. *En prensa*. doi: 10.1016/j.anai.2018.01.018.